Institut d'Hygiène et de Bactériologie de l'Université de Berne
(Directeur: Prof. Dr C. Hallauer)

Etude sur l'anatoxine diphtérique:

purification et concentration par la salure
(sulfate de soude)

et la chromatographie
(oxyde et hydroxyde d'alumine)

Thèse

présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Berne
pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie

par

PIERRE CALPINI

de Sion (Valais)

1944.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546501_0017

Institut d'Hygiène et de Bactériologie de l'Université de Berne
(Directeur: Prof. Dr C. Hallauer)

Etude sur l'anatoxine diphtérique:

purification et concentration par la salure
(sulfate de soude)

et la chromatographie
(oxyde et hydroxyde d'alumine)

Thèse

présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Berne
pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie

par

PIERRE CALPINI

de Sion (Valais)

Sion / Imprimerie Fiorina et Pellet / 1944

Acceptée par la Faculté de Médecine sur la proposition du Prof. Dr C. Hallauer.

Berne, le 23 février 1944.

Le Doyen de la Faculté de Médecine :

Prof. Dr E. Glanzmann.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A ma mère

Je remercie ici mon maître, Monsieur le Professeur Hallauer, ainsi que Monsieur le P.-D. Dr Regamey, d'avoir bien voulu diriger le présent travail.

La vaccination antidiphtérique exige des anatoxines d'origine à valeur antigénique élevée. Bien que le pouvoir immunisant d'un toxoïde ne soit pas toujours fonction directe de son titre floculant, le service fédéral de l'hygiène publique en Suisse, par exemple, ne tolère que des anatoxines diphtériques ayant une valeur égale ou supérieure à 30 U. F. (unités floculantes) par cc. Lors de la préparation des toxines diphtériques, on observe des taux antigéniques fort variables d'un lot à l'autre : certaines toxines dépassent 50 U. F./cc, mais d'autres n'atteignent pas 20 U. F./cc. Tels quels, les mauvais lots de toxine et, partant, d'anatoxine sont inutilisables ; aussi leur *régénération* pose-t-elle un réel problème d'ordre économique.

Cette régénération implique deux processus qui peuvent être consécutifs ou simultanés. En *concentrant* le toxoïde brut, par simple évaporation, on obtient un nombre relativement plus élevé d'U. F. par cc, mais le taux des albumines non spécifiques du vaccin augmente aussi. Toute concentration doit donc s'accompagner d'une *purification,* c'est-à-dire d'une élimination des substances superflues au développement de l'immunité.

Indépendamment de sa nécessité au cours des méthodes de concentration, la purification du toxoïde diphtérique semble indiquée pour des motifs d'ordre beaucoup plus général. L'anatoxine s'obtient par détoxication de la toxine au formol. Or, à l'état brut, la toxine diphtérique recueillie par filtration du milieu liquide où les corps bactériens se sont développés, est un mélange fort complexe ; outre le poison proprement dit, elle contient tout une gamme de corps albumineux non spécifiques : produits issus du bouillon de viande ou de la peptone, produits du métabolisme bactérien, produits d'autolyse microbienne enfin. Ces corps étrangers à la toxine constituent le *ballast ;* inoculés chez l'homme, ils se comportent souvent comme des anaphylactogènes. Toutefois ce ballast n'est pas sans importance dans l'élaboration de l'immunité. Une anatoxine purifiée immu-

nise mal, non seulement parce qu'elle est trop vite résorbée dans l'organisme, mais aussi parce qu'elle ne déclenche pas cette inflammation locale si utile au développement des anticorps. Pour remplacer l'action favorisante des protéines non toxiques et pour allonger la présence de l'antigène, on recourt volontiers aujourd'hui aux méthodes de précipitation par l'alun ou d'adsorption sur oxyde d'aluminium.

Certains auteurs ont cherché à préparer des toxines diphtériques pures, dépourvues de ballast, pour en déterminer la nature chimique. *Eaton* (1) à l'aide de *sels de cadmium* et *d'aluminium* ainsi que par précipitation isoélectrique par l'acide phosphotungstique, *Papenheimer* (2) par précipitation fractionnée au *sulfate d'ammonium*, *Boivin* (3) par extraction à *l'acide trichloracétique* combinée à l'adsorption sur charbon, *Pope* et *Lingod* (4), en utilisant la méthode d'adsorption par *l'hydroxyde d'aluminium*, réussirent à isoler une toxine diphtérique plus ou moins pure. Ils ont trouvé que cette toxine, substance colloïdale à grosses molécules, était de nature protéinique (eu- et pseudo-globulines) ; elle ne dialyse pas, se décompose rapidement sous l'action de la chaleur (60°) ou des acides forts. Bien qu'encore grossière, cette connaissance de l'essence chimique de la toxine diphtérique a permis d'utiliser, pour la concentration du principe vénéneux, les différentes méthodes s'appliquant à la précipitation des corps albumineux.

La précipitation par les *acides (Watson* et *Wallace)* (5) permet de séparer le principe actif de la majeure partie de ses composés non spécifiques ; elle présente cependant de gros désavantages : perte assez considérable du pouvoir antigénique, précipitation des nucléoprotéines bacillaires indésirables, produits instables. On n'obtient par *l'alcool (Hansen* et *Schmidt)* (6) qu'une toxine atténuée et relativement impure ; l'alcool méthylique donne les produits les plus purs. Malheureusement, les toxines ainsi purifiées ont perdu la propriété de floculer en présence du sérum antidiphtérique. L'alcool éthylique est moins efficace, mais il altère moins la toxine. *L'acétone (Wadsworth, Quigley* et *Sickles* (7), donne à ses expérimentateurs des résultats peu encourageants, tandis que *Theorell* et *Norlin* (8) obtiennent une très grande purification de l'anatoxine diphtérique. *L'ultrafiltration* est d'une efficacité li-

mitée, car elle ne permet pas d'éliminer les protéines et les protéoses dont les dimensions moléculaires sont voisines de celles de la toxine ; elle est cependant recommandée par *Zajdel* (9) ; son emploi est simple.

Nous nous sommes proposé d'étudier la purification et la concentration de l'anatoxine diphtérique en nous adressant à deux méthodes : celle de la salure par le *sulfate de sodium* et celle de *l'adsorption* par la chromatographie. Dans une série d'expériences, nous avons combiné les deux méthodes.

Pour apprécier la valeur d'une méthode de purification (ou de concentration), il y a lieu de conclure sur les points suivants :

1. La purification proprement dite.

Chaque anatoxine est caractérisée par son titre antigénique et son taux d'azote total. Le rapport

$$\frac{\text{mgr N/U.F. de l'anatoxine brute}}{\text{mgr N/U.F. de l'anatoxine purifiée}}$$

exprime le degré de purification réalisée. Ce rapport correspond à ce que nous appellerons *l'index P.*

Pour déterminer *l'azote total*, nous nous sommes adressé à la méthode de Kjeldahl : 1 cc du liquide à analyser est dilué dans 4 cc d'eau distillée. 1 cc de cette dilution est porté dans un ballon de Kjeldahl, dans lequel on ajoute successivement :

1 pointe de couteau de catalyseur ($CuSO_4 + K_2SO_4$)
5 cc d'eau distillée
1 cc d'acide (acide phosphorique + acide sulfurique)
1 perle de verre.

Le tout est calciné sur une flamme de gaz. Le liquide limpide qui en résulte est titré à l'acide sulfurique et la soude caustique centinormaux.

Le titre *antigénique* fut recherché par la méthode de floculation. Nous avons rencontré souvent des difficultés à titrer directement les produits pauvres en toxoïde. Dans ces cas, nous avons eu recours au principe de l'anatoxine «entraîneuse» : l'antigène à l'étude était additionné ex-tempore d'une anatoxine-étalon, floculant bien. Un simple calcul permettait par la suite de déduire le taux en U.F. de cet antigène. Voici un exemple de cette technique :

Tubes	1	2	3	4	5
Recherche de .. U.F./cc dans l'anatoxine 1080	6	9	12	15	18
Sérum-étalon titrant 300 U.F./cc	0,20	0,22	0,24	0,26	0,28
Mélange de : anatoxine 1080 + anatoxine-étalon titrant 24 U.F./cc	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Floculation après 3 h. 50 à 54°	—	—	+	+++	+

La floculation maxima est apparue dans le 4me tube qui contenait : 0,26 cc de sérum à 300 U.F./cc soit 78 U.F. Ces 78 U.F. ont réagi avec 4 cc du mélange d'antigène dont 1 cc correspond ainsi à 19,5 U.F. Dans 1 cc de ce mélange il y avait 0,5 cc d'anatoxine «entraîneuse» (à 24 U.F./cc) soit 12 U.F. Par conséquent l'anatoxine 1080 contient 19,5—12=7,5 U.F. par 0,5 cc et titre 15 U.F./cc.

2. Les pertes d'antigène.

Les pertes d'antigène que l'on enregistre au cours de la purification ou de la concentration sont de deux ordres : les unes sont imputables aux abandons de matériel sur les filtres, les parois des récipients et les instruments ; les autres sont inhérentes à la méthode et, comme nous le verrons plus loin, aux propriétés si individuelles des différents échantillons d'anatoxine.

3. La valeur antigénique du produit purifié.

Contrairement à l'opinion émise autrefois par *Ramon* (10), qui admettait le titre floculant d'une toxine ou d'une anatoxine comme valeur antigénique intrinsèque, c'est-à-dire un pouvoir immunisant directement proportionnel à la teneur en U.F. de l'anatoxine, *Prigge* (11) soutient qu'on ne peut mettre en parallèle la capacité immunisante d'une anatoxine avec son pouvoir floculant : en effet, certains toxoïdes provoquent des anticorps beaucoup plus abondants que d'autres plus riches en U.F. Ainsi, le titre antigénique à lui seul

ne renseigne pas exactement sur le pouvoir antigénique des préparations. Il semble que le temps de floculation joue aussi un rôle : plus le toxoïde flocule rapidement, meilleur est son pouvoir antigénique.

Une anatoxine purifiée semblerait être a priori un plus mauvais antigène que le toxoïde original (pour un même nombre d'U.F./cc), car l'efficacité de l'antigène n'est pas appuyée par l'activité non spécifique du ballast. Aussi le contrôle d'un produit purifié implique-t-il l'expérimentation sur l'animal. Dans nos recherches, nous nous sommes contenté, dans la règle, des indications livrées par la floculation, car d'une part nous comparions des échantillons bruts et purifiés d'un même toxoïde et, d'autre part, nous n'avions qu'un nombre limité d'animaux à notre disposition.

I. Précipitation par salure

Jusqu'ici le sel le plus employé fut le *sulfate d'ammonium*. *Brandjwick* et *Tasman* (12) estiment que les protéines de la toxine sont précipitées par des quantités de sel variant entre 250 et 450 grammes par litre d'anatoxine. Ils ont purifié le produit initial environ 30 fois, récupérant de 50 à 60 % de l'antigène contenu dans le toxoïde original et trouvèrent que les toxines à faible teneur en protéines étaient proportionnellement mieux purifiées que celles contenant beaucoup d'albumines. Les mêmes auteurs (13) ont encore augmenté la qualité de leur produit final en répétant la précipitation : la substance recueillie lors d'une première salure est dissoute dans l'eau, dialysée et reprécipitée par une nouvelle quantité de sel. *Tasman* et *Wassbergen* (14) ont obtenu des résultats sensiblement voisins par l'emploi du sulfate d'ammonium. S'adressant au *phosphate de calcium*, *Ando* et *Komiyama* ont constaté qu'à pH plus élevé, l'anatoxine est mieux purifiée ; mais le rendement est moins élevé.

Le sulfate de soude, que nous avons utilisé, a l'avantage d'être moins toxique et un peu plus maniable (prix, vitesse de solubilité, etc.) que son homologue ammoniacal. Les souris qui reçoivent sous-cutané 1 cc de $(NH_4)_2SO_4$ en solution à 4 % succombent en 20 minutes, au bout de deux heures seulement si elles sont traitées avec du Na_2SO_4 à 10 %. Dans les antigènes concentrés, il reste très souvent des traces de sel, qui seront moins toxiques s'il s'agit du sel de Glauber. Nous avons utilisé le *natrium sulfuricum purissimum* de Siegfried S. A., ci-devant B. Siegfried, Zofingue (Suisse) et des lots de 10 à 35 litres de toxoïde diphtérique formolé, titrant 9,5 à 40 U.F./cc ; ces toxoïdes étaient issus de toxines formolisées à 6 pour mille et laissées à l'étuve à 37 ° pendant 6 à 8 semaines.

Technique de la salure.

L'anatoxine est soigneusement pesée, puis versée dans un récipient d'aluminium. Le liquide est chauffé sur un réchaud de gaz jusqu'à ce qu'il atteigne la température de 37°, tandis qu'on le remue constamment ; il est conservé à cette température pendant toute l'expérience au bain-marie, dans le but de faciliter la dissolution du sel. En pratique, l'adjonction de sulfate de soude provoque une légère réaction exotherme, qui suffit à maintenir l'anatoxine à la température voulue pendant toute la durée de l'opération.

Dans la règle, nous versons une première quantité de sel correspondant au 20 % du poids de l'anatoxine ; le liquide est remué jusqu'à dissolution complète du sel et laissé au repos pendant 15 minutes. Il se forme à la surface de l'anatoxine une mousse qui est soigneusement recueillie et pesée. Nous continuons la salure en ajoutant 5 % de sel, recueillons la mousse après 15 minutes, rajoutons 5 % de sel et répétons les mêmes opérations jusqu'à saturation. Nous obtenons ainsi tout une série de mousses correspondant aux diverses fractions de la salure : mousse recueillie à 20 % de salure, mousse recueillie entre 21 et 25 % de salure etc. L'anatoxine est saturée de sulfate de soude lorsque le sel atteint la concentration de 45 à 50 %. Cette limite diffère avec les différents échantillons examinés ; elle est d'autant plus basse que la teneur en protéines de l'anatoxine est plus élevée.

Les mousses sont dissoutes dans de l'eau distillée à 40°, versées dans des boyaux ou sacs de cellophane et dialysées en présence d'eau courante pendant 3 à 5 jours, moment où, par la réaction au chlorure de baryum, ne subsistent plus que des traces de SO_4. Le «*concentré*» ainsi obtenu est alors exactement mesuré, passé sur filtre Seitz K, puis E.K. Stérile, il est conservé à la glacière sous couche de toluol. Nous en déterminons le titre floculant et la teneur en protéines.

Expérience No 1.

10 litres d'anatoxine diphtérique 1109, titrant 18 U.F. et 7,28 mgr. d'azote total au cc sont traités par des doses croissantes de sulfate de soude. La dernière portion, qui correspond à 51—55 % de salure n'est prélevée que le lendemain, le mélange d'anatoxine et de sel étant gardé pendant la nuit dans un thermostat à 37°.

TABLEAU 1.

Variations des volumes de liquide pendant la dialyse.

% de $Na_2 SO_4$	Poids de la mousse (en gr.)	Volume du concentré (en cc) avant la dialyse	Volume du concentré (en cc) après la dialyse	Variations de volume en cc	Variations de volume en % du volume initial	Variations de volume en % de poids du la mousse
20	10	80	87	+ 7	8,75	**70**
21-25	14	80	89	+ 9	11,25	**64**
26-30	30	80	116	+ 36	45	**120**
31-35	66	80	160	+ 80	100	**121**
36-40	75	100	180	+ 80	80	**107**
41-45	21	100	160	+ 60	60	**286**
46-50	21	100	162	+ 62	62	**295**
51-55	35	70	160	+ 90	128,6	**257**

Les mousses ont des *aspects* et des *consistances* très différentes. A 20 %, la mousse est écumeuse, légère, blanchâtre et ne colle pas. A 25 %, elle est de même consistance, un peu brunâtre. De 30-35 %, la couleur passe progressivement au brun foncé, la consistance devient de plus en plus visqueuse et la mousse adhère fortement aux instruments. Les *quantités* de mousse sont aussi variées suivant le degré de salure ; elles augmentent régulièrement pour atteindre un maximum entre 36 et 40 % : dès lors, les fractions ultérieures de sel n'arrachent que beaucoup moins de mousse.

Pendant la dialyse, il y a *attraction* d'eau dans le sac de cellophane. Si l'on examine les variations de volume en fonction du poids de la mousse, on constate que

la dilution du concentré au cours de la dialyse est d'autant plus grande que l'échantillon de mousse fut recueilli à une concentration saline plus élevée, c'est-à-dire que la mousse est d'autant plus hydrophile qu'elle est plus visqueuse.

Chaque concentré dialysé fut ramené dans cette expérience à 200 cc par adjonction d'eau. Après filtration et titration, nous avons cherché l'index P (cf. page 7).

TABLEAU 2.

Détermination de l'index P.

Echantillon	U.F./cc	Mgr. N/cc	Mgr. N/U.F.	P
Anatoxine diphtérique 1109	**18**	**7,28**	**0,404**	**(1)**
20 %	< 20	2,64	—	—
21—25 %	< 20	3,024	—	—
26—30 %	240	15,752	0,066	6,1
31—35 %	215	17,848	0,083	4,9
36—40 %	130	16,744	0,128	3,2
41—45 %	48	9,93	0,206	2,0
46—50 %	< 20	8,88	—	—
51—55 %	< 20	8,75	—	—

Dans cette première expérience, nous n'avons pas recouru à la technique de l'anatoxine «entraîneuse». Les échantillons à 20, 21-25, 46-50 et 51-55 % n'ont pas floculé ; leur teneur en antigène la plus forte correspond à une salure de 26-30 %. C'est à ce taux de salure encore que l'index P est le plus grand, que l'U.F. est le plus pauvre en azote,

puisque le 85 % de l'azote original a disparu. A partir de la concentration saline à 30 %, l'index P baisse régulièrement.

Le total des pertes de substances au cours des différentes opérations ressort du tableau suivant :

TABLEAU 3.

Bilan des pertes (U.F. et N).

Echantillon	Volume avant filtration	U. F.		Mgr. N total	
		par cc	total	par cc	total
Anatoxine	**(10 litres)**	**(18)**	**(180,000)**	**(7,28)**	**(72,800)**
20 %	200 cc	—	—	2,64	528
21-25 %	200 cc	—	—	3,02	604
26-30 %	200 cc	240	48 000	15,75	3 150
31-35 %	200 cc	215	43 000	17,85	3 570
36-40 %	200 cc	130	26 000	16,74	3 348
41-45 %	200 cc	48	9 600	9,93	1 986
46-50 %	200 cc	—	—	8,88	1 176
51-55 %	200 cc	—	—	8,75	1 750
	Récupération		126 600		16 712
	Pertes		53 400		56 088
			(30 %)		(77 %)

Des 180,000 U.F. présentes au début de l'expérience, le 70 % fut récupéré. Les pertes portent sur le matériel aban-

donné au cours des différentes manipulations, les fractions non titrables de 4 échantillons et sur la proportion non précipitable de l'antigène. Par contre, dans l'ensemble, le 77 % des protéines totales fut rejeté avec le sel.

Expérience No 2.

Calquée sur la précédente, cette expérience en diffère par le fait que les mousses furent reprises non dans une quantité identique d'eau (200 cc) mais dans des volumes choisis arbitrairement et compatibles avec une dissolution satisfaisante.

Bien que la même anatoxine diphtérique 1109 fût soumise à la salure, les mousses obtenues ici aux différentes concentrations de sulfate de soude sont un peu différentes de celles recueillies lors de la première expérience : dès 20 %, la mousse est colorée en brun-clair ; à 25 % elle est déjà légèrement visqueuse.

TABLEAU 4.

Variations des volumes de liquide pendant la dialyse.

% de $Na_2 SO_4$	Poids de la mousse	Volume du conc. (en cc) avant la dialyse	Volume du conc. (en cc) après la dialyse	Variations de volume en cc	Variations de volume en % du volume initial	Variations de volume en % du poids de la mousse
20	30	80	112	+ 32	+ 40	+ 107
21—25	10	100	112	+ 12	+ 12	+ 120
26—30	68	180	324	+144	+ 80	+ 212
31—35	31	100	180	+ 80	+ 80	+ 258
36—40	39	120	214	+ 94	+ 78	+ 241
41—45	12	120	138	+ 18	+ 15	+ 150
46—50	25	120	140	+ 20	+ 17	+ 80

Le poids des mousses recueillies n'est pas le même que précédemment : la courbe, régulièrement ascendante, puis descendante en fonction du taux de salure est ici absente. Le poids total pour les 7 échantillons de mousse est de 215 grammes, tandis qu'il était de 237 grammes dans notre premier essai.

Les variations de volume pendant la dialyse sont également différentes ; au lieu d'augmenter régulièrement avec la concentration saline, le volume de l'eau attirée dans le sac de cellophane présente ici une courbe à double inclinaison, avec maximum à 31-35 % de salure.

Les titrations des U.F., les dosages de l'azote et la détermination de l'index P sont rapportés dans le tableau suivant :

TABLEAU 5.

Détermination de l'index P.

Echantillon	U.F./cc	Mgr./cc	Mgr./U.F.	P
Anatoxine diphtérique 1109	**18**	**7,28**	**0,404**	**(1)**
20 %	15	1,398	0,093	4,3
21—25 %	56	2,512	0,045	10,1
26—30 %	180	12,85	0,071	5,7
31—35 %	69	9,42	0,136	2,9
36—40 %	28	10,42	0,372	1,1
41—45 %	9	5,73	0,637	0,6
46—50 %	7	5,02	0,717	0,5

Comme précédemment, c'est entre 26 et 30 % de salure qu'apparaît la mousse la plus abondante et que se forme le concentré de plus haut titre floculant. L'échantillon obtenu

à 20 % de salure contient déjà des U.F. en quantité décelable. La teneur en U.F. des concentrés suit, en fonction du taux de sulfate de soude une courbe régulièrement ascendante, jusqu'à 26-30 % de sel, puis progressivement descendante. Les deux derniers concentrés sont très pauvres en antigène. La purification optima est obtenue avec le concentré à 21-25 %, où l'U.F. a perdu le 90 % de ses protéines non spécifiques. Plus la salure augmente, plus l'U.F. est riche en azote total et les deux derniers concentrés contiennent plus d'azote par U.F. que l'anatoxine originale.

TABLEAU 6.

Bilan des pertes (U.F. et N).

Echantillon	Volume avant filtration	U. F.		Mgr. N. Total	
		par cc	Total	par cc	Total
Anatoxine diphtér. (1109)	**(10 litres)**	**(18)**	**(180,000)**	**(7,28)**	**(72,800)**
20 %	112 cc	15	1 680	1,398	156,6
21—25 %	112 cc	56	6 272	2,512	281,3
26—30 %	324 cc	180	58 320	12,85	4163,4
31—35 %	180 cc	69	12 420	9,42	1695,6
36—40 %	214 cc	28	5 992	10,42	2229,9
41—45 %	138 cc	9	1 242	5,73	790,7
46—50 %	140 cc	7	980	5,02	702,8
	Récupération		86,906		10020,3
	Pertes		93,094 (52 %)		62779,7 (86 %)

Les 7 échantillons de concentré ne contiennent au total que le 48 % de l'antigène présent dans les 10 litres d'anatoxine diphtérique, tandis que le 86 % de l'azote total fut éliminé. Cette expérience 2, conduite avec la même quantité d'une même anatoxine que lors de l'expérience 1 donne des résultats qui ne sont pas superposables : le poids des mousses recueillies aux mêmes concentrations salines, le taux en antigène et en azote des différentes fractions, les pertes totales d'antigène et les index de purification sont forts différents.

Expérience No 3.

20 litres d'une nouvelle anatoxine diphtérique 1132, titrant 14 U.F. et 7,948 mgr. d'azote total au cc sont traités comme précédemment par le sulfate de soude.

Les précipités obtenus par adjonction fractionnée de sel correspondent à nos observations antérieures : à 20 %, la mousse est blanchâtre, très légère et se dissocie facilement à la surface du liquide ; à 25 %, la consistance augmente et la couleur devient plus foncée ; les concentrations supérieures ramènent des mousses de plus en plus foncées, visqueuses et collantes. La dialyse fut effectuée pendant 6 jours.

TABLEAU 7.

Variations des volumes de liquide pendant la dialyse.

% de $Na_2 SO_4$	Poids de la mousse (en gr.)	Volume du concentré		Variations de volume		
		avant la dialyse	après la dialyse	en cc	en % du volume initial	en % du poids de la mousse
20	136	—	—	—	—	—
21—25	145	275	330	+ 55	+ 20	+ 38
26—30	83	220	350	+130	+ 59	+157
31—35	188	450	860	+410	+ 91	+218
36—40	183	350	830	+480	+137	+262
41—45	84	450	516	+ 66	+ 14	+ 79
46—50	30	220	250	+ 30	+ 14	+100

Le poids des mousses ne suit pas ici la progression que nous avions relevée antérieurement. Par contre, l'attraction d'eau dans le sac de cellophane au cours de la dialyse augmente à partir des faibles concentrations salines, atteint un certain maximum avec la fraction salée à 36-40 % et diminue ensuite. L'échantillon à 20 % de sulfate de soude fut perdu au cours des premières manipulations.

Les titrages des U.F. et de l'azote total sont rapportés dans le tableau suivant :

TABLEAU 8.

Détermination de l'index P.

Echantillon	U.F./cc.	Mgr. N/cc.	Mgr. N/U.F.	P
Anatoxine diphtérique 1132	**14**	**7,984**	**0,569**	**(1)**
20 %	—	—	—	—
21—25 %	66	1,040	0,016	35,5
26—30 %	145	4,256	0,029	19,6
31—35 %	125	11,600	0,093	6,1
36—40 %	58	13,776	0,238	2,4
41—45 %	35	10,832	0,309	1,8
46—50 %	23	10,336	0,449	1,3

Le concentré le plus riche en U.F. correspond à une concentration saline de 26-30 %, mais l'échantillon suivant à 31-35 % jauge encore un fort titre antigénique. Les concentrés ultérieurs contiennent de moins en moins d'U.F. au cc.

L'index P suit ici une courbe très régulière : plus les échantillons sont obtenus à haute concentration, plus ils

sont riches en azote total. La purification du concentré à 21-25 % est relativement énorme, puisque l'U.F. n'y contient seulement que le 2,6 % de l'azote lié à l'U.F. de l'anatoxine originale. Entre 46 et 50 % de salure, on récolte encore un échantillon plus riche en U.F. que l'anatoxine 1132 mais contenant un peu moins de protéines.

TABLEAU 9.

Bilan des pertes (U.F. et N).

Echantillon	Volume avant filtration	U. F.		Mgr. N total	
		par cc.	total	par cc.	total
Anatoxine diphtérique 1132	**(20 litres)**	**(14)**	**(280 000)**	**(7 984)**	**(159 680)**
20 %	—	—	—	—	—
21—25 %	330	66	21 780	1,040	343,2
26—30 %	350	145	50 750	4,256	1489,6
31—35 %	860	125	107 500	11,600	9976,0
36—40 %	830	58	48 140	13,776	11434,1
41—45 %	516	35	18 060	10,832	5589,3
46—50 %	250	23	5 750	10,336	2584,0
	Récupération		251 980		31416,2
	Pertes		28 020		128263,8
			(10 %)		(80 %)

Cette troisième expérience solde avec un excellent résultat. Même en ne tenant pas compte des U.F. perdues avec l'échantillon à 20 % de salure, nous récupérons le 90 %

de l'antigène présent dans le toxoïde original. Dans l'ensemble, l'élimination de l'azote atteint 80 %. La répartition absolue des U.F. dans les divers concentrés suit une courbe à double inclinaison, avec optimum entre 31 et 35 % de salure, où se retrouve le 38 % de l'antigène total.

Expérience No 4.

Cette série d'essais, conduite avec un toxoïde de haute valeur antigénique (40 U.F. et 5,989 mgr. d'N par cc) avait pour but, entre autre, de déterminer les rôles des différentes filtrations sur membranes Seitz, quant à la teneur en azote et U.F. de l'antigène ; cette teneur pouvait être éventuellement influencée par des phénomènes de rétention ou d'adsorption au niveau des membranes. La technique resta la même que précédemment. La dialyse ne fut poussée que pendant 48 heures ; à ce moment, seuls quelques échantillons accusaient encore une faible réaction positive au sulfate de baryum.

L'expérience ne porte que sur les précipitations fractionnées de 20 à 45 %.

Nous avons utilisé 10 litres de toxoïde diphtérique 218.

TABLEAU 10.

Variations des volumes de liquide pendant la dialyse.

% Na_2SO_4	Poids de la mousse recueillie après la salure (en gr.)	Volume du concentré (en cc.) avant la dialyse	Volume du concentré (en cc.) après la dialyse	Variations de volume en cc	Variations de volume en % du volume initial	Variations de volume en % du poids de la mousse
20	27,0	77,0	73,0	— 4	— 5,2	— 15
21—25	22,5	72,5	72,0	— 0,5	— 0,68	— 2
26—30	92,5	242,5	240,0	— 2,5	— 1,00	— 3
31—35	27,0	77,0	87,0	+ 10	+ 13	+ 37
36—40	45,0	95,0	117,0	+ 22	+ 23	+ 49
41—45	33,0	83,0	109,0	+ 26	+ 31	+ 79

Le poids des mousses manifeste une grande irrégularité d'un échantillon à l'autre ; la salure à 26-30 % donne la récolte la plus abondante.

Lors de la dialyse, qui fut opérée sur des volumes relativement faibles de dissolvant et pendant 48 heures seulement, nous notons que l'eau du cristallisoir ne passe pas dans le concentré lorsque ceux-ci furent obtenus à des concentrations égales ou inférieures à 30 % de sulfate de soude. La perte apparente de liquide s'explique vraisemblablement par les abandons de matériel dans les replis du sac de cellophane. Les protéines recueillies à un taux de salure supérieur à 30 % sont par contre hydrophiles et d'autant plus actives qu'elles sont recueillies à une salure plus élevée.

TABLEAU 11.

Détermination de l'index P avant et après les filtrations sur Seitz.

Echantillon	U. F./cc		Mgr. N cc		Mgr. N U F.		P	
	avant	après	avant	après	avant	après	avant	après
	les filtrations sur membranes Seitz (K et EK)							
Anatoxine diphtérique 218	**40**		**5,989**		**0,150**		**(1)**	
20 %	1100	1075	6,181	6,765	0,0056	0,0063	26,8	23,8
21—25 %	850	825	8,540	9,970	0,010	0,012	15,0	12,5
26—30 %	725	760	18,640	19,835	0,026	0,026	5,8	5,8
31—35 %	450	400	16,790	17,035	0,037	0,043	4,1	3,5
36—40 %	230	230	20,850	20,659	0,091	0,089	1,6	1,7
41—45 %	100	105	19,830	18,790	0,198	0,179	0,8	0,8

Les titrages d'azote et d'antigène livrent des résultats légèrement différents avant et après les filtrations sur membranes Seitz. Ces variations sont minimes pour la valeur antigénique. Les augmentations se répartissent sur les échantillons de concentré aussi bien avant qu'après la dialyse ; elles ne dépassent pas 11 % et peuvent rentrer encore dans le cadre des variations expérimentales (erreurs intrinsèques de la méthode de floculation). Les différences entre les taux d'azote après passages sur membranes Seitz portent sur des augmentations pour tous les échantillons recueillis à 35 % et en-dessous de salure, sur de légères diminutions pour les échantillons ultérieurs : ces différences sont légères dans la règle et peuvent relever des erreurs de la méthode de Kjeldahl ; elles sont parfois élevées, atteignant 16 % par exemple pour le concentré à 26-30 %. Pour les 4 premiers échantillons, tout se passe comme si les passages à travers les membranes Seitz entraînaient une faible quantité de corps azotés étrangers à l'antigène.

L'anatoxine diphtérique 218 possédait un titre antigénique élevé : 40 U.F./cc. Les concentrés obtenus sont très riches en antigènes : celui recueilli à 20 % de salure contient plus de 1000 U.F./cc. ; les titres baissent progressivement en fonction du taux salin, mais le concentré à 41-45 % jauge encore un certain nombre d'U.F. au cc. L'échantillon à 20 % est non seulement le concentré possédant le titre antigénique le plus élevé, mais encore celui le plus pauvre en azote ; son index P est d'environ 24, c'est-à-dire qu'il représente une élimination du 95,8 % de l'azote. P varie en fonction inverse du taux de salure et l'échantillon à 41-45 %, bien qu'il soit plus concentré que l'anatoxine 218, accuse par U.F. une plus grande charge d'azote : la concentration de l'antigène ne s'y accompagne pas d'une purification.

Quelle est maintenant la récupération de l'antigène ? (tableau 12).

TABLEAU 12.

Bilan des pertes (U.F. et N).

Echantillon	Volume après filtration	U. F.		Mgr. N total	
		par cc.	total	par cc.	total
Anatoxine diphtérique 218	**(10 litres)**	**(40)**	**(400 000)**	**(5,989)**	**(59,890)**
20 %	73 cc.	1075	78 475	6,765	493,5
21—25 %	72 cc.	825	59 400	9,970	717,8
26—30 %	240 cc.	760	182 400	19,835	4760,4
31—35 %	87 cc.	400	34 800	17,035	1482,0
36—40 %	117 cc.	230	26 910	20,659	2417,1
41—45 %	109 cc.	105	11 445	18,790	1972,9
	Récupération		393 400		11843,7
	Pertes		6 750		48046,3
			(2 %)		(80 %)

Là encore la majorité de l'antigène se recueille avec l'échantillon à 26-30 % de salure. L'anatoxine 218 est un type de toxoïde qui permet une très bonne concentration et une purification poussée, transformations qui n'entraînent presque aucune perte de substance active.

Expérience No 5.

Dans cet essai, au lieu d'ajouter à un volume donné d'anatoxine diphtérique des doses toujours croissantes de sulfate de soude pour recueillir des mousses fractionnées,

nous avons préparé une série d'échantillons de toxoïde de même volume (4 litres), ajouté au premier lot 20 % de sel, au second lot en une seule fois 25 % de sel, etc. Les mousses représentent ainsi le total de l'antigène qui réagit à une concentration saline déterminée.

Le toxoïde à l'épreuve était constitué par un mélange de diverses anatoxines portant les numéros 260 à 265 ; il titrait 10,5 U.F./cc. et 8,256 N au cc.

La dialyse dura trois jours.

TABLEAU 13.

Variations des volumes de liquides pendant la dialyse.

% $Na_2 SO_4$	Poids de la mousse (en gr.)	Volume du conc. (en cc.)		Variation de volume		
		avant la dialyse	après la dialyse	en cc.	en % du volume initial	en % du poids de la mousse
20	15	33	60	27	81	180
25	30	40	100	60	150	200
30	79	100	222	122	122	154
35	98	130	280	150	115	153
40	125	160	330	170	106	136
45	138	190	408	218	114	158
50	132	180	385	205	114	155

Jusqu'à 45 % de salure, le poids de la mousse augmente progressivement avec le taux de sulfate de soude. Passé 45 %, qui correspond à peu près à la saturation, il n'y a pas de nouvelle mousse. Les variations des volumes de liquide

pendant la dialyse sont toutes du même sens si l'on ne considère que les valeurs absolues : jusqu'à saturation, il y a augmentation régulière de l'eau absorbée dans le sac de cellophane. En exprimant les passages de liquide en fonction des volumes initiaux des concentrés, on constate que les déplacements d'eau sont à peu près constants pour chaque échantillon, avec un minimum à 20 % et un maximum à 25 %. Cette constance d'hydrophilie se répète si l'on calcule les augmentations en fonction du poids de la mousse.

TABLEAU 14.

Détermination de l'index P.

Echantillon	U.F./cc.	Mgr. N/cc.	Mgr. N/U.F.	P
Anatoxine diphtérique 260-265	**10,5**	**8,256**	**0,786**	**(1)**
20 %	?	3,010	?	?
25 %	?	3,488	?	?
30 %	34	12,736	0,375	2,1
35 %	33	15,120	0,458	1,7
40 %	80	17,488	0,218	3,6
45 %	75	17,568	0,234	3,4
50 %	90	17,840	0,198	3,9

L'anatoxine diphtérique 260-265 était de mauvaise qualité. Issue de la souche Park-Williams No 8, conservée à Londres, elle formait pendant son séjour à l'étuve un fort précipité (bouillon de culture trop riche en substances protéiniques ?). Les concentrés à 20 et à 25 % ne donnèrent aucune floculation, même en présence d'une anatoxine entraîneuse. Le tableau 14 sera discuté avec le tableau suivant.

TABLEAU 15.

Bilan des récupérations (U.F. et N).

Echantillon	Volume récupéré	U. F.			Mgr. N total		
		par cc	au total	en %	par cc.	au total	en %
Anatox. diphtér. 260-265	**(4 litr.)**	**(10,5)**	**(42,000)**	**(100)**	**(8,256)**	**(33,024)**	**(100)**
20 %	60 cc.	—	—	—	3,010	180,6	**0,5**
25 %	100 cc.	—	—	—	3,488	348,8	**1**
30 %	222 cc.	34	7,548	**18**	12,736	2827,4	**9**
35 %	280 cc.	33	9,240	**22**	15,120	4233,6	**13**
40 %	330 cc.	80	26,400	**63**	17,488	5971,0	**18**
45 %	408 cc.	75	30,600	**73**	17,568	7167,7	**22**
50 %	385 cc.	90	34,650	**82**	17,840	6868,4	**21**

Dans les expériences antérieures, nous avions vu que l'optimum de concentration et de purification, c'est-à-dire le taux salin où la majorité de l'antigène était récupéré avec un fort allègement du taux de l'azote, correspondait aux fractions salées à 25-35 %. Le mélange des mauvaises anatoxines 260-265 ne donne un rendement passable qu'à partir de 40 % de salure ; à ce taux de sulfate de soude, on retrouve dans le concentré les deux tiers de l'antigène, mais un cinquième seulement de l'azote ; l'index P n'est que de 3,6. En utilisant des salures plus fortes que 40 %, on récupère un peu plus d'antigène, mais l'index P ne varie pas beaucoup. A saturation, on recueille le 82 % des U.F. présentes dans le toxoïde original, tandis que le 79 % de l'azote original fut éliminé.

Expérience No 6.

Nous avons étudié ici le mécanisme de deux salures successives.

10 litres d'anatoxine diphtérique 167, qui titre 22,5 U.F. et 6,614 mgr. d'azote au cc. sont traitées suivant le schéma suivant :

10 litres de toxoïde

+ 30 % sulfate de soude (concentré I)		+ 31-50 % de sulfate de soude (concentré II)	
+30% Na_2SO_4 (concentré Ia)	+31-50% Na_2SO_4 (concentré Ib)	+30% Na_2SO_4 (concentré IIa)	+31-50% Na_2SO_4 (concentré IIb)

On ajoute donc à 10 litres de toxoïde 3 kgr. de sulfate de soude, recueille la mousse (concentré I) puis traite le liquide avec 2 nouveaux kgr. de sel ; la nouvelle mousse forme le concentré II. Chaque concentré est dissout dans de l'eau dont le volume est ramené à 2000 cc. ; il est ensuite filtré sur papier. On prélève alors de chaque échantillon 50 cc. pour les diverses titrations et les 1950 cc. restants sont précipités à nouveau, séparément, une première fois avec 30 % de sel (concentrés Ia et IIa) puis à 31-50 % (concentrés Ib et IIb). Après dissolution dans l'eau, les quatre nouvelles mousses sont dialysées pendant 3 jours et filtrées sur Seitz K et EK. Nos observations sont résumées dans le tableau 16.

TABLEAU 16.

Détermination de l'index P et du bilan des pertes en U.F. et N au cours de deux salures successives.

Echantillon	Volume du concentré (en cc.)	U. F.		Mgr. N. total			P
		par cc.	récupérées en %	par cc.	récupérés en %	par U.F.	
Anatoxine diphtérique 167	**(10 000)**	**(22,5)**	**(100)**	**(6,614)**	**(100)**	**(0,294)**	**(1)**
	Première salure						
Concentré I (30 %)	2000	58	52	2,123	6	0,037	7,9
Concentré II (31-50 %)	2000	47	42	3,854	12	0,082	3,6
	Seconde salure						
Concentré Ia (30 %)	100	975	46*	17,800	2,8*	0,018	16.3
Concentré Ib (31-50 %)	50	62	1*	4,126	0,3*	0,067	4,4
Concentré IIa (30 %)	100	490	23*	18,390	3,0*	0,037	7,9
Concentré IIb (31-50 %)	100	138	7*	19,095	3,0*	0,138	2,1

*) = Pourcentage calculé sur les valeurs de l'anatoxine originale, mais compte tenu du prélèvement de 50 cc après la première salure.

L'anatoxine 167 se prête bien à la salure par le sulfate de soude. L'adjonction en une fois de 30 % de sel ramène une mousse contenant le 52 % de l'antigène original et qui, dissoute ad 2000 cc avec de l'eau, donne un concentré ne contenant plus que 0,037 mgr. N par U.F. ; l'index P est de 7,9. L'adjonction ultérieure de 20 % de sulfate de soude permet de récupérer environ 42 % de l'antigène original, mais le concentré ne présente plus qu'un index P de 3,6.

Dans le second temps de l'opération, nous avons précipité les 2 premiers concentrés. L'échantillon *Ia* contient encore le 46 % de l'antigène, mais celui-ci est maintenant 16 fois purifié : il titre 975 U.F./cc et l'U.F. n'est liée qu'à 0,018 mgr. d'azote. Le concentré *IIa* est aussi intéressant, puisqu'il titre 490 U.F./cc et que l'index P atteint 7,9. Lors de la seconde salure, les concentrés *Ib* et *IIb* obtenus entre 31 et 50 % de sulfate de soude sont pratiquement peu avantageux : ils sont pauvres en antigène et relativement mal purifiés.

La méthode des salures successives permet donc d'obtenir, pour une anatoxine donnée, des produits plus concentrés en antigène et plus purs.

DISCUSSION

Mélangé à l'anatoxine diphtérique, le sulfate de soude provoque l'apparition d'une mousse à la surface du toxoïde A faible salure, 20 %, la mousse recueillie est légère, peu colorée, facilement dissociable avec un instrument et peu adhérente aux récipients ; elle se dissout facilement dans l'eau à 37-40°. En ajoutant de nouvelles fractions de sel, 5 % par exemple, il se forme à chaque salure une nouvelle mousse qui devient de plus en plus brunâtre et foncée, de plus en plus visqueuse, collante aux parois et se dissolvant lentement dans l'eau tiède.

Poids des mousses.

Les 4 premières expériences furent conduites selon la même technique avec trois anatoxines différentes. Les mousses recueillies aux divers taux de salure n'ont pas le même poids d'un échantillon de toxoïde à l'autre. Les poids totaux du matériel recueilli jusqu'à salure à saturation (45 %) sont les suivants (pour 10 litres de toxoïde) :

Expérience	No 1 :	anatoxine	1109 : 216 gr.
»	No 2 :	»	1109 : 190 gr.
»	No 3 :	»	1132 : 408 gr.
»	No 4 :	»	218 : 247 gr.

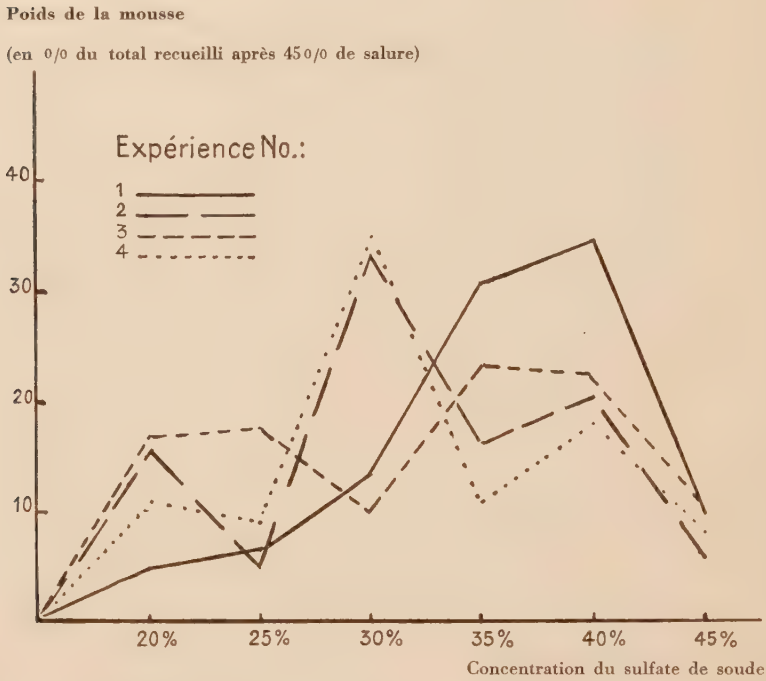
La récolte totale des mousses est donc fort variable pour chaque anatoxine diphtérique, elle est aussi variable pour un même échantillon de toxoïde d'une opération à l'autre.

Quelles sont les fractions les plus riches en matériel brut ? Dans le tableau 17, nous rapportons sous forme de courbe les poids des mousses récoltées à chaque taux de salure.

TABLEAU 17.

Répartition du poids des mousses pour chaque fraction de salure.

(Les poids sont exprimés en % du poids total des mousses recueillies de 20 à 45 % de salure).



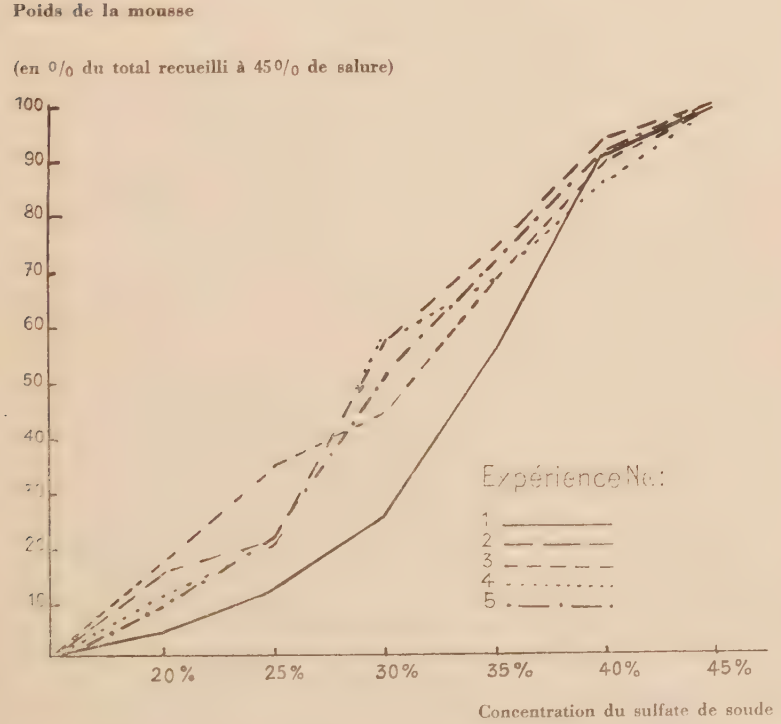
Le profil des courbes du graphique précédent démontre que *chaque anatoxine réagit à la salure selon une certaine individualité.* Dans les expériences 2 et 4, c'est à 30 % de sulfate de soude que s'obtient le maximum de matériel ; dans l'essai 1, c'est à 35-45 % que les mousses sont les plus abondantes, tandis que l'anatoxine de l'expérience 3 donne une courbe assez plate, déprimée à 30 % de sel.

Dans le graphique du tableau 18, nous avons analysé le total du poids des mousses recueillies. Pour les expériences 1 à 4, le poids des mousses à 30 % par exemple est déter-

miné par l'addition des mousses récoltées à 20 %, 25 % et 30 % de salure ; pour l'expérience 5, nous avions la quantité totale recueillie en une seule salure à 30 %. Mis à part l'essai 1, où la précipitation mit longtemps à s'amorcer, toutes les courbes sont semblables : calculées sur le total de la mousse apparaissant à 45 % de sulfate de soude, le poids relatif des mousses *est fonction directe du taux de la salure.*

TABLEAU 18.

Total des mousses (en poids) recueillies à une concentration déterminée de sulfate de soude.



De quels éléments constitutifs de l'anatoxine dépend le poids des mousses que fait apparaître la salure ? Dans le tableau 19, nous cherchons les relations entre le poids total des mousses recueillies à 45 % de salure pour 10 litres de toxoïde d'une part et le titre antigénique ou la teneur en azote total d'autre part.

TABLEAU 19.

Relations entre le poids des mousses, le titre antigénique et le taux de l'azote total.

Expérience No 1	1	2	3	4	5
Poids des mousses à 45 % de salure pour 10 litres de toxoïde (en gr.)	216	190	408	247	345
U F./cc.	18	18	14	40	10,5
Mgr. N. total/cc.	7,28	7,28	7,98	5,98	8,26

Du tableau 19 il ressort que la quantité de mousse n'est fonction ni de la valeur antigénique du toxoïde, ni de sa teneur en azote total.

Hydrophilie des mousses.

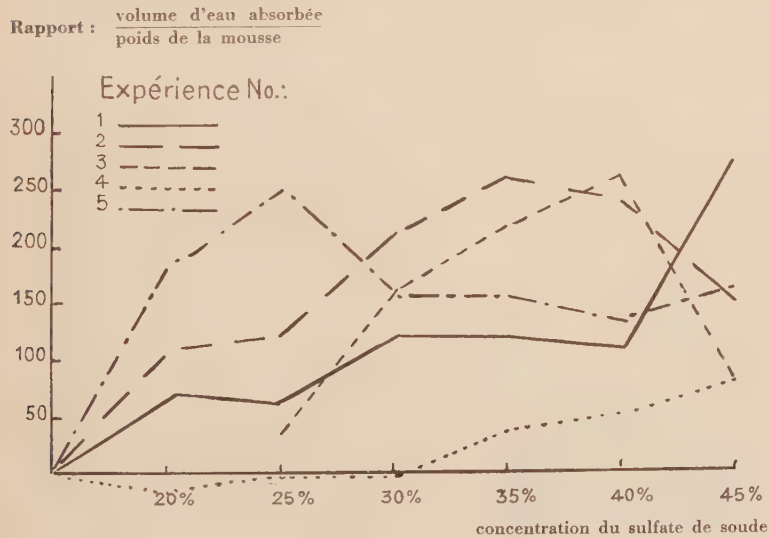
Récoltées, les mousses furent dissoutes dans de l'eau tiède et soumises à la dialyse. Pendant la dialyse, il s'établit un échange de liquide entre le contenu du sac de cellophane et l'eau du cristallisoir. On observe dans la règle une augmentation de volume pour le concentré ; cette osmose est conditionnée par les composants du concentré (ions salins, matières protéiniques), par la durée de la dialyse. Le degré d'hydrophilie du concentré pouvait nous renseigner dans une certaine mesure sur la nature chimique des composés azotés, les globulines fixant moins d'eau que les albumines. Nos mensurations ne donnent cependant pas de résultats probants, car les quantités d'eau passant dans le sac de cel-

lophane ne semblent pas suivre de loi apparente. Cette absence de constante est imputable aux variables de l'opération ; diversité du poids des mousses et diversité des volumes de liquides où ces mousses furent dissoutes : toutes choses restant égales d'ailleurs, un concentré plus dilué a moins tendance à absorber de liquide qu'un concentré plus riche en matières azotées ; diversités dans la durée de la dialyse : dans l'expérience 4, où la dialyse ne fut poussée que 48 heures, les variations de volume sont beaucoup plus faibles que dans l'expérience 3, où la dialyse fut poursuivie pendant 6 jours.

Dans le tableau 20, nous donnons par exemple les absorptions d'eau calculées en pourcentages du poids initial de la mousse.

TABLEAU 20.

Variations des concentrés au cours de la dialyse en fonction du poids initial de la mousse.



Que l'on considère les variations de volume en elles-mêmes, ou en égard du volume de concentré mis à la dialyse, ou encore en fonction du poids initial de la mousse, il semble que l'on puisse toutefois en déduire (cf. tableau 1, 4, 7, 10) qu'aux faibles concentrations salines, il y a faible attraction d'eau ; les protéines du concentré seraient du type globuline. Par contre, à partir des salures supérieures à 30 %, la quantité d'eau absorbée devient beaucoup plus grande et fait penser aux propriétés des albumines (les mousses sont aussi beaucoup plus visqueuses). Cette augmentation parallèle de la viscosité, de l'hydrophilie par rapport au taux de salure, ressort particulièrement bien de l'expérience 4, où la dialyse ne dura que deux jours.

Pourtant l'expérience 5, où les divers échantillons de toxoïde furent en un temps salés à 20, 25, 30 etc. %, donne un autre résultat : le volume d'eau absorbée (cf. tableau 13 et graphique 20) en fonction du poids de la mousse est à peu près *le même pour toutes les salures ;* il en est de même si l'on rapporte les augmentations de liquide au volume initial du concentré avant la dialyse.

Concentration de l'antigène.

Nous *admettrons* pour la discussion de nos résultats obtenus in vitro que la floculation permet de déterminer la valeur antigénique de toxoïde (cf. pages 8 et 9).

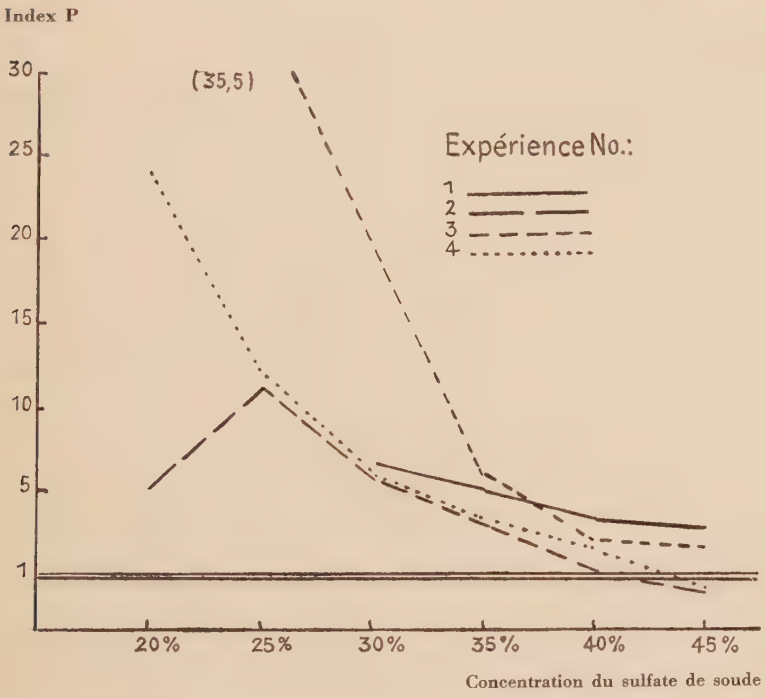
Les anatoxines diphtériques soumises à la salure titraient de 10,5 à 40 U.F. au cc. Les concentrés réalisèrent des titres fort variables atteignant (expérience 4) plus de *1000 U.F./cc.* Le traitement de ces anatoxines permet donc un *fort enrichissement de l'antigène.* Pour obtenir ces concentrés, nous avons dissout les mousses dans un certain volume de liquide choisi arbitrairement ; une dissolution des mousses dans des volumes d'eau plus faibles aurait permis de réaliser des antigènes encore plus concentrés. Ce sont les échantillons récoltés à *faible salure* qui livrent les titres les plus élevés, parce que l'antigène y est le plus pur.

Purification de l'antigène.

Les fractions recueillies après salures successives n'ont pas le même titre antigénique ; de plus, l'U.F. contient encore plus ou moins de ballast. La recherche de *l'index P* permet d'établir le degré de purification c'est-à-dire le rapport entre l'azote total lié à l'U.F. de l'anatoxine originale et l'azote total de l'U.F. du concentré. Plus l'index P est élevé, plus la purification est grande.

TABLEAU 21.

Index P pour les concentrés en fonction du taux de salure.



Les fractions d'antigène les plus purifiées correspondent toujours aux plus faibles salures, lorsque la concentration en sulfate de soude ne dépasse pas 25 %. Autrement dit, *l'antigène est plus électivement séparé à basse salure*. Par contre, plus les taux de sel sont élevés, plus l'antigène s'accompagne de ballast azoté ; parfois même, le concentré contient plus d'azote par U.F. que l'anatoxine originale, mais ce phénomène n'apparaît que pour les échantillons à haute salure.

L'élimination de l'azote atteint des taux élevés :

Expérience No 1 : échantillon à 30 % = *83,6 %*
» No 2 : » » 25 % = *90,1 %*
» No 3 : » » 25 % = *97,2 %*
» No 4 : » » 20 % = *95,8 %*

Ainsi dans l'échantillon le plus favorable que nous avons préparé, nous ne retrouvons par U.F. que le 2,8 % de l'azote original.

Un antigène purifié une première fois peut subir une perte encore plus grande de son azote s'il est traité à nouveau par le sulfate de soude : notre concentré (expérience 6) contenant encore 12,5 % d'azote après la première salure, n'en possède plus que 6,1 % après un second traitement.

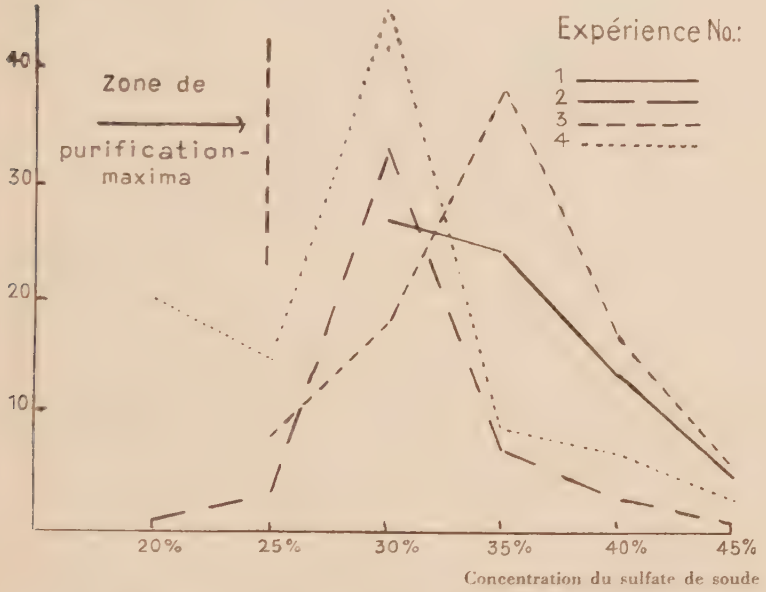
En règle générale, ce sont les concentrés les plus riches en U.F. qui renferment proportionnellement le moins d'azote.

Répartition de l'antigène.

C'est donc entre 20 et 25 % de salure que l'on obtient les antigènes les plus purs. Ces taux salins correspondent-ils aux zones qui permettent l'isolement quantitatif optimum ?

TABLEAU 22.

Répartition des U.F. dans les différentes fractions obtenues par la salure.



Le graphique précédent (tableau 22), construit selon les données des tableaux 3, 6, 9 et 12, nous apprend que *l'extraction maxima de l'antigène ne se trouve pas dans la zone de purification optima* (cf. tableau 21). Lorsque l'index P est le plus élevé, soit 20-25 % de salure, il ne passe que peu d'antigène dans le concentré. C'est à 30-35 % que se retrouve le plus grand nombre des U.F. présentes dans le toxoïde original.

Utilisation pratique de la salure au sulfate de soude.

La salure au sulfate de soude permet une concentration et une purification du toxoïde. Il faut, pour qu'elle soit uti-

lisable en pratique, qu'elle fournisse encore un bon rendement. L'étude de la salure fractionnée nous permet de fixer les principes de la méthode.

En salant une anatoxine à 30-35 % on doit extraire la plus grande partie des unités floculantes et une quantité relativement faible de ballast azoté. Le reste de l'antigène peut être extrait par une concentration plus forte de sulfate de soude, et salé une seconde fois (expérience 6). Le premier temps de l'opération nous a donné les résultats indiqués dans le tableau 23.

TABLEAU 23.

Récupération des U. F. par salure unique à 30, 35 et 45 %.

	Taux de sulfate de soude		
	30 %	35 %	45 % (à satur.)
	U.F. récupérées en %		
Expérience No 1	27	51	70
Expérience No 2	37	44	48
Expérience No 3	26	64	87
Expérience No 4	80	89	98
Expérience No 5	18	22	73
Expérience No 6	52	—	92

Si les anatoxines diphtériques ont chacune leur individualité propre dans leur comportement au cours des divers temps de la salure, elles révèlent aussi des possibilités d'extraction variables. Les unes permettent une excellente récupération de l'antigène à 30 % déjà (expérience 4). Pour la plupart des toxoïdes, un résultat satisfaisant n'est obtenu

qu'à 35 % de sulfate de soude. A saturation, nous regagnons presque toujours la majorité des U.F.

L'expérience 6, où nous avons traité une anatoxine jouissant d'aptitudes moyennes à la salure, permet d'illustrer les différentes phases d'une concentration de toxoïde par le sulfate de soude :

a) Après salure à 30 %, on obtient un concentré contenant le *52* % des U.F. originales avec $P = 7{,}9$;

b) La seconde fraction obtenue entre 30 % et saturation de sel, livre un concentré qui, reprécipité à 30 % de sulfate de soude donne encore un antigène contenant le *23* % des U.F. originales avec $P = 7{,}9$;

c) Au total nous retrouvons, purifié *8 fois,* le *75* % de l'antigène présent dans l'anatoxine originale.

II. Chromatographie

C'est *Schmidt* (15, 16, 17) qui, le premier, adopta pour la concentration et la purification de l'anatoxine diphtérique, la méthode que *Willstätter* (18, 19) avait préconisée pour l'enrichissement et l'isolement des diastases : adsorption par l'hydrate d'aluminium et élution protéineuse par une solution de phosphate de sodium. Le pH joue un grand rôle dans l'adsorption ; son optimum fut reconnu par *Schmidt* entre 5,5 et 6,5. La méthode fut reprise ensuite par *Tasman, Brandjwick* et *Wassbergen* (12, 13, 14) qui l'ont comparée à la technique de purification par le sulfate d'aluminium ; ces auteurs concluent que la préférence doit aller à l'adsorption, si l'on recherche un produit purifié, mais à la précipitation par salure si l'on désire un enrichissement. *Jensen* (20) immunisa des enfants par une seule injection d'anatoxine diphtérique purifiée à l'hydrate d'alumine et constata que l'immunité débutait le 3me jour pour augmenter progressivement jusqu'au 9me jour.

Glenny et ses collaborateurs (21, 22, 23), puis *Park* et *Schröder, Havens* et *Wells* ont proposé la méthode d'adsorption par l'alun potassique. En traitant le toxoïde avec 2-2,5 % d'alun, on obtient un produit libéré du 70 % de son azote, avec 20-30 % de pertes d'antigène. *Tasman* et *Pondman* (24) relèvent que la précipitation au sulfate d'aluminium et l'adsorption par l'alun donnent des résultats à peu près équivalents.

L'hydroxyde de zinc ne donna pas de résultats à *Ohyama. Klobutsitzky* (26) ne fut pas plus heureux avec le caolin.

L'adsorption par l'hydrate de magnésium fut proposée par *Ecker* et *Wead* (25) ; le produit purifié est floculable, mais ne crée pas d'immunité chez les lapins.

Nous nous sommes demandé si la méthode d'adsorption par chromatographie de *Tswett* (27) [cf. *Zechmeister* et *von Cholnoky* (29)] permettait de concentrer et de purifier l'anatoxine diphtérique. *Ballinari* (28) utilisa le premier cette méthode pour adsorber les toxines diphtérique et tétani-

que : l'adsorption la meilleure fut obtenue avec l'oxyde d'aluminium à pH 5,3 à 6,0, soit dans les zones déjà fixées par *Schmidt*. Les bons résultats de *Ballinari* intéressent les toxines : les essais pratiques sur l'anatoxine diphtérique se révélèrent beaucoup moins fructueux.

Technique.

Nous avons conservé la technique décrite par *Ballinari*, ne lui apportant que de minimes améliorations d'ordre pratique. L'adsorbant (sel d'aluminium) est contenu dans un tube de verre d'un diamètre de 12-15-20 mm. et forme une «colonne» reposant sur un treillis métallique, appuyé lui-même sur un bouchon de caoutchouc percé. Le tube de verre est fixé sur un flacon qui permet de faire le vide. Le liquide à chromatographier traverse la colonne de haut en bas, favorisé par la légère pression négative qu'on obtient dans le flacon au moyen d'une pompe à eau.

L'adsorption par chromatographie comprend en principe les temps suivants :

a) Création d'une colonne d'adsorbant qui, perfusée, laisse passer et sortir un liquide de pH déterminé (les oxydes d'aluminium étant alcalins, il est nécessaire de «laver» au préalable la colonne jusqu'à l'obtention du pH désiré).

b) expulsion de la colonne hors de son manteau de verre,

c) élution. Nous avons généralement divisé la colonne (10-15 cm. de haut) en deux moitiés : l'une supérieure, l'autre inférieure. Chaque segment est trituré dans un mortier avec deux grammes de phosphate bibasique de soude : le tout est porté dans une bouteille avec de l'eau distillée à 40°. Cette suspension est placée dans un agitateur pendant une heure, puis centrifugée à 2500 tours-minute. Le liquide qui surnage est recueilli, tandis que le culot est repris dans un mortier, trituré avec 2 grammes de phosphate bibasique de soude, agité avec de l'eau distillée tiède. Cette deuxième portion de liquide, recueillie après centrifugation, est jointe à la première : le tout est filtré sur Seitz K et E.K., puis conservé à la glacière sous couche de toluol.

d) Les *titrages* de l'antigène et de l'azote furent conduits selon les mêmes principes que précédemment.

Les sels auxquels nous nous sommes adressé sont les suivants :

Al_2O_3 : Aluminium oxydatum purissimum (Siegfried S. A., Zofingue) ;

Al_2O_3 : Aluminium oxydatum selon Brockmann (Merck, Darmstadt) ;

$Al(OH)_3$: Aluminium oxydatum hydricum No 1093 (Merck, Darmstadt) ;

Alucol : (Wander S. A., Berne).

A. Détermination du pH d'absorption optima.

Expérience No 1.

L'anatoxine diphtérique 1130 a un pH de 6,1 et titre 17 U.F./cc. Elle est répartie dans 3 ballons de 200 cc. et le pH est ajusté à 7,5-5,5-3,5. A pH 3,5 le toxoïde se trouble et flocule en partie spontanément (point isoélectrique). Le contenu de chacun des ballons est passé sur une colonne de chromatographie avec Al_2O_3 (Siegfried) comme adsorbant. A sa sortie de la colonne, le filtrat est recueilli par fractions de 50 cc. L'élution, séparée pour les deux moitiés de la colonne, est effectuée dans 20 cc. d'une solution tampon de Sörensen à pH 7,5. Les résultats du titrage sont les suivants :

à pH 7,5 : toutes les portions du filtrat contiennent 14 U.F./cc ; l'élution des deux segments de la colonne ne livre aucun antigène. Il n'y a pas eu d'adsorption ;

à pH 5,5 : les 4 portions du filtrat titrent respectivement 3, 6, 7 et 7 U.F./cc. 1950 U.F. furent donc retenues dans la colonne. L'éluat de la moitié supérieure de l'adsorbant titre 24 U.F./cc et celui de la moitié inférieure 17 U.F./cc. Nous avons donc récupéré 480+340 U.F. = 820 U.F. soit le 40 % de l'antigène fixé à l'oxyde d'aluminium ou le 27 % de celui qui perfusa la colonne ;

à pH 3,5 : l'adsorbant joue en plus le rôle de filtre, puisqu'il retient les particules floculées à ce pH si acide. Il n'y a plus trace d'antigène dans les filtrats. Par contre, l'éluat supérieur titre 63 U.F. et l'inférieur 10 U.F./cc. L'élution récupère environ le 50 % du toxoïde perfusé.

Cette expérience démontre que l'adsorption du toxoïde diphtérique sur l'oxyde l'aluminium est meilleure en milieu acide, d'autant meilleure que le pH est plus bas.

Expérience No 2.

Cet essai étudie l'adsorption en milieu acide, mais pour des pH supérieurs au point isoélectrique de l'anatoxine.

Le toxoïde diphtérique 1165, de pH 6,0, titrant 17 U.F./cc et 5,95 mgr. d'azote total par cc, fut passé à travers 4 colonnes aux pH suivants : 6,5-6,0-5,5 et 5,0. Les colonnes n'avaient cette fois-ci qu'une hauteur de 1,5-2,0 mm., le tube de verre étant remplacé par un *entonnoir de porcelaine à fond plat*. L'adsorbat fut élué dans une solution de phosphate bibasique de sodium à 4 % et ramené au volume primitif du toxoïde (100 cc). L'adsorbant était représenté par Al_2O_3 (Brockmann) à raison de 20 grammes par colonne.

La coloration des liquides manipulés donne à première vue une idée de l'adsorption : plus le pH est acide, plus les filtrats sont clairs ; les éluats par contre présentent le phénomène inverse.

TABLEAU 24.

Résultats des titrages de l'antigène et de l'azote.

(anatoxine originale : 17 U.F. et 5,95 mgr. N/cc)

pH de la colonne	6,5	6,0	5,5	5,0
Filtrats :				
U.F./cc	3,5	— 2	— 2	≤ 2
U.F. adsorbées	80 %	env. 100 %	env. 100 %	env. 100 %
mgr. N/cc	3,50	3,70	4,05	3,86
Pertes d'azote dans la colonne	43 %	38 %	32 %	35 %
Eluats :				
U.F./cc	12	13	15	15
U.F. récupérées au total	71 %	77 %	88 %	88 %
mgr. N/cc	2,01	1,68	1,66	2,02
azote original resté adsorbé dans la colonne	8 %	9 %	4 %	0,2 %
Index P	2,1	2,7	3,2	2,6

L'oxyde d'aluminium de Merck a bien fixé l'antigène dans la colonne. A pH 6,5 le 80 % des U.F. est adsorbé ; sitôt que le pH atteint 6,0 et moins, les filtrats n'ont plus trace d'antigène ; l'adsorption est totale. Cependant les filtrats contiennent encore de l'azote. L'antigène fixé sur l'oxyde d'aluminium est donc moins riche en azote que le toxoïde original ; il est purifié.

L'élution fut bonne, puisque à pH 5,5 et 5,0 le 88 % de l'antigène fut récupéré. Les éluats sont des solutions de toxoïde purifié, l'index P oscillant entre 2,1 (à pH 6,5) et 3,2 (à pH 5,5).

Les trois colonnes à faible pH donnent des résultats presque semblables, les différences relevées en faveur de la colonne à pH 5,5 pouvant rentrer encore dans le cadre des variations expérimentales.

Dans l'ensemble, la chromatographie ne semble cependant pas une méthode d'un intérêt pratique intense, car la concentration de l'antigène est faible et la purification est loin d'atteindre les valeurs que nous avons obtenues avec la salure au sulfate de soude.

Expérience No 3.

Conduite selon les mêmes principes que la précédente, cette expérience n'en diffère que par la plus grande quantité d'anatoxine diphtérique perfusée (200 cc au lieu de 100 cc) et le choix des pH : 6,5-6,0 et 5,0.

La meilleure adsorption fut notée dans la colonne à pH 6,0 où *l'index P* atteint dans l'éluat la valeur de 7. L'élution récupère le 85 % des unités originales.

Expérience No 4.

Nous avons utilisé un autre toxoïde, l'anatoxine diphtérique 1126, titrant 17 U.F. et 6,37 mgr. d'azote au cc. Quatre colonnes à pH 6,5-6,0-5,5 et 5,0 sont perfusées avec 200 cc d'antigène, les conditions expérimentales restant les mêmes que pour l'exercice précédent. Cependant, les résultats que nous relevons sont fort différents.

La couleur des filtrats et celle des éluats est identique à chaque pH ; nous ne retrouvons pas les gammes d'intensité

notées plus haut. L'adsorption est faible ; les filtrats des quatre colonnes titrent encore 6 U.F./cc. Les éluats ne contiennent que le 32 à 41 % de l'antigène original. Si le rendement quantitatif n'est pas favorable, la purification est par contre moyenne : elle est d'autant plus grande que le pH est plus bas, passant de Index P = 4 (pour la colonne de pH 6,5) à Index P = 7,7 (pour la colonne de pH 5,0).

Nous avons exécuté encore d'autres séries d'expériences pour déterminer la valeur du pH optimum. Nous en concluons que le pH, s'il joue un rôle capital dans l'adsorption par l'oxyde d'aluminium, peut revêtir cependant une certaine élasticité et que *la zone favorable est située entre pH 5,0 et pH 6,0 ;* nous n'avons pas pu fixer de point plus précis, même en utilisant des colonnes aux pH étagés de 0,2 en 0,2.

B. Recherche de l'adsorbant optimum.

Les quatre sels d'aluminium que nous avions à disposition ne présentaient pas tous le même aspect macroscopique. L'hydrate d'aluminium de *Merck* est une poudre fine, poussiéreuse ; la même préparation de *Wander* est plus grossière. L'oxyde d'aluminium selon *Brockmann* est une poudre fine, légèrement granuleuse ; l'oxyde de *Siegfried* est formé de particules moins tenues.

Chaque expérience fut conduite sur entonnoir de porcelaine à fond plat.

Expérience No 5.

100 cc d'anatoxine diphtérique 1165 (pH original 6,0 ; 17 U.F. et 5,95 mgr. d'azote/cc) passent à travers 30 gr. d'adsorbant. La vitesse d'écoulement est réglée de telle façon que le total du liquide s'écoule en 30 minutes. L'élution fut réalisée comme précédemment avec 4 % de phosphate bibasique de sodium.

Les quatre sels d'aluminium furent étudiés au même pH : 5,0

TABLEAU 25.

Comparaison du pouvoir adsorbant de quatre sels d'aluminium à pH 5,0.

	$Al(OH)_3$		Al_2O_3	
	Merck	Wander	Siegfried	Brockmann
pH à l'entrée	5,0	5,0	5,0	5,0
à la sortie de la colonne	5,1	5,1	5,1	5,0
Filtrats :				
Couleur	jaune	brun	jaune foncé	jaune foncé
U.F./cc	pas de flocul.	14	3	3
Mgr. N/cc	3,29	5,32	2,73	3,15
Eluats :				
Couleur	brun	brun clair	brun	brun
U.F./cc	13	pas de flocul.	11	10
U.F. **originales** récupérées	**76 %**	?	**65 %**	**59 %**
Mgr N/cc	1,81	0,21	2,24	1,96
Mgr N **original** récupéré	**30 %**	**3 %**	**38 %**	**33 %**
Index P	2,5	?	1,7	1,8
U.F. **éluées** de la colonne	76 %	?	79 %	71 %
Mgr N **élué** de la colonne	68 %	33 %	69 %	70 %

Les colonnes lavées au préalable ne varient pas sensiblement leur pH au cours du passage de l'anatoxine.

Il y a de grosses différences entre les pouvoirs adsorbants des quatre colonnes. L'hydroxyde d'aluminium Wander (Alucol) donne un filtrat aussi foncé que l'anatoxine originale ; il ne retient que des traces d'antigène ou d'azote.

Des trois autres adsorbants, c'est *l'hydroxyde d'aluminium de Merck* qui fixe le mieux l'antigène, puisque ce dernier fait complètement défaut dans le filtrat ; ce produit n'associe à la totalité de l'antigène que le 45 % de l'azote

original. Après élution, nous récupérons le 76 % des U.F. présentes dans l'anatoxine brute et le 30 % de l'azote. L'index P est de 2,5.

Les deux autres adsorbants, tous deux des oxydes d'aluminium, adsorbent un peu moins bien que l'hydrate de Merck ; ils permettent une récupération de 59-65 % des U.F. originales et l'index P oscille autour de 1,7 et de 1,8.

Du tableau 25 nous tirons la conclusion suivante : l'élution au phosphate bibasique de sodium n'est pas parfaite et n'extrait que le 71-79 % de l'antigène fixé sur l'adsorbant ; il y a donc perte de 21-29 % de toxoïde. L'élution libère un même pourcentage d'azote fixé sur la colonne (pratiquement le même pour les trois adsorbants actifs : 68, 69 et 70 %). *Il n'y a donc au cours de l'élution, aucun processus de purification ; l'amélioration de l'index P relève entièrement de la phase d'adsorption.*

La répétition de cette expérience conduisit toujours aux mêmes résultats : meilleure performance de l'hydroxyde d'aluminium de Merck, mêmes index de purification. Nous pûmes par la suite mettre en évidence un faible pouvoir adsorbant de l'hydrate d'aluminium de Wander (Alucol) ; ce sel ne laissa récupérer toutefois que le 17 % de l'antigène original, avec index P = 2,5.

C. Recherche de la capacité maxima d'adsorption.

La capacité d'adsorption pour une colonne de poids donné présente des limites. Nous avons essayé de la déterminer en nous adressant :

a) à l'anatoxine brute ;

b) à l'anatoxine diluée.

Expérience No 6.

Le même toxoïde 1165 est passé sur une colonne de 15 grammes d'hydroxyde d'aluminium de Merck. L'adsorption est fixée à pH 5,0. Nous perfusons 6 colonnes dans les mêmes conditions de pression, la première avec 20 cc., la

seconde avec 50 cc et les autres respectivement 75, 100, 150 et 200 cc d'anatoxine. L'élution fut réalisée avec 4 % de phosphate bibasique de soude (50 cc de liquide).

TABLEAU 26.

Adsorption maxima pour 15 gr. d'Al $(OH)_3$ (Merck) à pH 5,0.
(Toxoïde diphtérique non-dilué)

Quantité de toxoïde perfusé	20 cc.	50 cc.	75 cc.	100 cc	150 cc	200 cc
pH du filtrat	5,0	5,2	4,9	5,0	5,0	5,1
Eluats :						
U.F./cc	6	10	13	14	20	20
U.F./50 cc	300	500	650	700	1000	1000
U.F. perfusées	340	850	1275	1700	2550	3400
U.F. récupérées	**88 %**	**59 %**	**51 %**	**41 %**	**39 %**	**29 %**

Plus il passe de toxoïde, moins il y a d'unités floculantes fixées et secondairement éluées. A mesure qu'on augmente la quantité de toxoïde, le pouvoir fixateur du sel d'aluminium baisse jusqu'au moment où la colonne est saturée, soit après passage de 150 cc d'anatoxine. En d'autres termes, *l'hydroxyde d'aluminium de Merk est saturé lorsqu'il est perfusé par 10 fois son poids de toxoïde ; l'adsorption est proportionnellement d'autant plus faible que le volume de toxoïde est plus grand.*

Expérience No 7.

Nous avons recherché si la dilution de l'anatoxine jouait un rôle sur l'intensité de l'adsorption. 50 cc de l'anatoxine diphtérique 1165 furent passés tels quels ou dilués avec de l'eau physiologique à 1 : 2 - 1 : 4, etc. L'opération fut effectuée à pH 5,0 ; la colonne d'adsorbant pesait 20 grammes. L'éluat fut ramené à 100 cc avec la solution phosphatée.

TABLEAU 27.

Intensité de l'adsorption de 20 gr. d'Al $(OH)_3$ (Merck) à pH 5,0 pour le toxoïde diphtérique dilué.

Dilution du toxoïde	1/1	1/2	1/4	1/6	1/10
Anatoxine 1165	50 cc.	50 cc.	50 cc.	50 cc.	50 cc.
Sol. physiologique	—	50 cc.	150 cc.	250 cc.	450 cc.
Eluats :					
U. F./cc.	8	8	7	7	7
Mgr. N/cc.	1,40	1,26	1,33	1,26	1,19
U.F. récupérées	94 %	94 %	82 %	82 %	82 %
N récupéré	24 %	21 %	23 %	21 %	20 %
Index P	**2,0**	**2,2**	**1,8**	**1,9**	**2,1**

Les 5 colonnes d'adsorbant donnent des résultats pratiquement semblables, les légères différences notées d'une dilution à l'autre rentrant dans le cadre des variations expérimentales. La *dilution du toxoïde* avant son passage sur l'adsorbant, *ne joue ainsi pas de rôle sur l'intensité de l'adsorption ;* ni la fixation de l'antigène, ni celle de l'azote non antigénique ne sont influencés.

Expérience No 8.

Tout l'antigène n'étant pas adsorbé après un premier passage à travers l'hydroxyde d'alumine, surtout lorsqu'on essaie de faire passer des volumes relativement élevés de toxoïde, il était indiqué de rechercher si le filtrat (contenant encore de l'antigène résiduel) permettait une nouvelle récupération d'antigène. 200 cc du toxoïde 1165 sont passés à pH 5,0 dans une colonne de 20 gr. d'hydroxyde d'aluminium (Merck). Le filtrat (I) est recueilli et passé sur une seconde colonne de 20 gr. ; le nouveau filtrat (II) est soumis à une dernière adsorption. Chaque colonne est éluée en solution phosphatée (100 cc).

TABLEAU 28.

Adsorption successive sur colonnes de 20 gr. d'Al $(OH)_3$ (Merck) à pH 5,0. Toxoïde diphtérique non-dilué.

Liquide perfusé	Anatoxine dipht. 1165	Filtrat I	Filtrat II
Volume	200 cc.	200 cc.	200 cc.
Eluats :			
U.F./cc	21	11	0
Mgr. N/cc	2,24	0,91	1,06
U.F. récupérées	62 %	32 %	0
Azote récupéré	38 %	15 %	18 %
Index P	3,3	4,3	

Après un premier passage dans la colonne, le 62 % de l'antigène se retrouve dans l'éluat ; le reste des U.F. a passé dans le filtrat dont on extrait à nouveau 32 % lors de la seconde chromatographie. Au total, les deux premières opérations ont redonné le 94 % de l'antigène original. Les 6 % qui manquent ne se retrouvent pas dans le troisième éluat, qui est dépourvu d'U.F. ; ces 6 % représentent entre autres les pertes inhérentes aux élutions incomplètes.

L'azote se retrouve dans les éluats ; il est plus abondant dans le premier que dans le second. La présence d'azote dans le 3me éluat et l'absence concommittente d'antigène démontre que l'adsorption par l'hydrate d'aluminium n'est pas spécifique pour l'antigène. Ce dernier se trouve toutefois lié aux corps protéiniques qui sont le plus rapidement fixés au sel.

Notons en passant que l'index P est ici relativement élevé puisqu'il atteint 3,3 dans le premier éluat et 4.3 dans le second.

D. Recherche du mode d'élution optimum.

Les protéines sont plus ou moins solidement fixées aux sels d'aluminium. L'adsorption étant pratiquée en milieu

acide, la simple élévation du pH en zone alcaline permet déjà de séparer l'antigène. Ainsi, en alcalinisant la suspension aqueuse où fut triturée la colonne d'hydroxyde d'aluminium (par adjonction de soude caustique ou d'ammoniaque à 5-10 % jusqu'à réaction nettement basique au tournesol), on obtient une élution. Au début de nos expériences, cette technique nous procura maints déboires : la recherche d'un pH optimum se heurte à l'apparition de gels d'aluminium, qui troublent la solution des protéines et s'accompagnent de précipitations qui rendent impossibles les titrations de l'antigène par la méthode de floculation.

Nous avons du revenir à la technique du phosphate bibasique Na_2HPO_4 proposée par *Schmidt* (30) qui utilisa des solutions à 2,4 - 4,8 %. *Tasman* et *Pondman* (24) préconisaient l'emploi d'une solution à 10 %. Nous avons trouvé qu'une solution à 4 % de phosphate bibasique suffisait et nous nous sommes arrêté à la méthode que nous avons décrite plus haut. Les liquides élués, décantés après centrifugation, sont placés à la glacière pendant 36 heures ; il se forme des cristaux de phosphate sur le fond du flacon. *L'éluat* est alors filtré sur membranes Seitz K puis E.K. ; on le conserve à la glacière sous couche de toluol.

E. Essais de chromatographie sur des concentrés d'anatoxine obtenus par salure au sulfate de soude.

Les antigènes purifiés obtenus par salure au sulfate de soude peuvent-ils être encore concentrés par chromatographie ?

Des expériences d'orientation démontrent que l'hydroxyde d'aluminium, le meilleur de nos adsorbants pour l'anatoxine diphtérique, n'avait pas les mêmes avantages sur les concentrés ; la colonne de sel se colmate très rapidement et le liquide ne passe plus, même lorsque le vide est très poussé. Nous sommes ainsi revenus à l'oxyde d'aluminium Al_2O_3 de Siegfried, dont le grain n'est pas aussi fin que celui des hydrates.

Expérience No 9.

Un concentré titrant 95 U.F./cc est dilué 1 : 2 avec du sérum physiologique. Des colonnes de 8 grammes d'Al_2O_3

(Siegfried) sont perfusées avec 100 cc de l'antigène dilué, l'adsorption étant réglée à pH 6.5 - 6,0 - 5,5 et 5,0. Nous retrouvons dans les filtrats :

à pH 6,5 : 87,5 %
à pH 6,0 : 66,6 %
à pH 5,5 : 58,3 %
à pH 5,0 : 47,9 %

de l'antigène. L'élution pratiquée avec de l'ammoniaque étendu d'eau révèle que l'adsorption est d'autant plus forte que le pH est bas.

Expérience No 10.

Un concentré titre 145 U.F. et 14,66 mgr. N/cc ; 25 cc sont passés (non-dilués) sur un entonnoir de 6 cm. de diamètre, contenant 25 gr. d'Al_2O_3. Elution avec 100 cc de solution phosphatée.

TABLEAU 29.

Chromatographie d'un concentré d'anatoxine diphtérique sur Al_2O_3 à pH 6,0 - 5,5 et 5,0.

pH de l'antigène	6,0	5,5	5,0
Couleur du filtrat	brun	brun-clair	jaune
Couleur de l'éluat	brun-clair	brun	brun
Eluats :			
U.F./cc	22	28	30
Mgr. N/cc	0,91	1,26	1,39
U.F. récupérées	60 %	77 %	81 %
Azote récupéré	25 %	34 %	38 %
Index P	2,4	2,2	2,2

De ce tableau il apert qu'une élution est d'autant plus riche que l'adsorption s'est faite à pH plus bas. A pH 5,0 on récupère par exemple le 81 % des U.F. originales, tandis que ce pourcentage n'est que de 60 à pH 6,0. Par contre, l'index P n'est pas plus favorable en milieu très acide ; à pH élevé, il y a moins bonne rétention d'antigène mais aussi

plus faible adsorption de protéines, si bien que l'index P est à peu près le même pour tous les pH.

Expérience No 11.

Ici, nous avons, comme plus haut pour l'anatoxine diphtérique, dilué le même concentré (16 cc) avant de le soumettre à l'adsorption. Toutes les colonnes furent étudiées à pH 5,0. Les résultats sont les suivants :

	Dilution du concentré	1 : 3	1 : 10	1 : 30
Eluats	U.F./cc	21	21	21
	Mgr. N/cc	1,82	1,54	1,40
	U.F. récupérées	91 %	91 %	91 %
	Index P	*1,1*	*1,4*	*1,5*

La dilution ne fut guère favorable à l'adsorption sélective de l'antigène. La purification est quasi-nulle ; tout se passe comme si le sel d'aluminium fixait aussi bien les protéines non spécifiques que le toxoïde. L'index P est légèrement supérieur lorsque l'antigène est plus dilué, mais dans la colonne où le concentré ne fut dilué que trois fois, nous obtenons un éluat qui contient presque autant d'azote par U.F. que le concentré original.

La différence entre les index P de l'expérience 10 d'une part et de l'expérience 11 d'autre part peut trouver une explication dans la nature réelle de l'adsorption : lorsqu'on perfuse un concentré non dilué, des phénomènes de *rétention mécanique* s'ajoutent aux processus d'adsorption proprement dite. Un concentré abandonne dans la colonne de l'antigène adsorbé et de l'antigène colmaté ; lorsqu'on dilue le concentré, on diminue les possibilités de colmatage.

Expérience No 12.

Dans cet essai, nous avons perfusé à pH 5,0 4 colonnes de 20 grammes d'$Al(OH)_3$ Merck avec une quantité de concentré dilué ou non et correspondant à 100 cc de l'anatoxine originale.

Les concentrés dilués 1 : 1 - 1 : 2 - 1 : 5 - 1 : 10 donnèrent des éluats titrant tous 15 U.F./cc au lieu des 17 calculées pour l'anatoxine originale. La récupération en U.F.

est donc de l'ordre de 88 %. Les index P oscillaient de *0,8 à 1,1,* c'est-à-dire qu'il n'existait pratiquement aucune purification.

DISCUSSION

Le but que nous poursuivions, en nous adressant à la chromatographie, était de concentrer et de purifier le toxoïde diphtérique.

Toutes nos expériences furent conduites avec des anatoxines de *mauvaise qualité,* dont le titre était inférieur ou égal à 17 U.F. par cc.

Le toxoïde, traversant des colonnes d'adsorbant à des pH variés, est fort diversément fixé. Dans la règle, plus le pH est bas, plus l'adsorption est grande. Toutefois la floculation spontanée du toxoïde au voisinage de son point isoélectrique (pH 4,7) impose quelques commentaires. En dessous de pH 5,0, la rétention de l'antigène reconnaît une double cause : l'adsorption proprement dite, puis un colmatage qui met en évidence le rôle de filtre joué par la colonne d'adsorbant. C'est pourquoi l'adsorption réelle doit être étudiée à des pH supérieurs à 5,0 ; son optimum ne revêt pas de limite aussi rigide que pour les *toxines* diphtérique ou tétanique [pH 5,5 - 5,7 selon *Ballinari* (28)]. L'adsorption est très nette à pII 6,0, plus marquée à pH 5,5 et 5,0.

L'élution de la colonne d'adsorbant récupère une très forte proportion de l'antigène perfusé, en général le 80-90 %. Mais l'éluat relativement pauvre en U.F. n'atteint pas les valeurs observées avec la salure au sulfate de soude ; il ne manifeste jamais plus de 4 fois (exp. 1) la teneur en U.F. de l'anatoxine originale. La *concentration* de l'antigène est donc *faible.*

La *purification* représentée par l'index P, est également peu intéressante : ci et là cet index P peut atteindre une valeur de 7 ou 8 (exp. 3 et 4) mais le plus souvent il ne dépasse pas 2 ou 3. La chromatographie du toxoïde diphtérique n'est pas, dans nos conditions d'expérience, une méthode utile de purification.

Des 4 adsorbants étudiés, c'est l'hydroxyde d'aluminium de Merck qui s'est révélé le plus efficace, tandis que celui

de Wander (Alucol) ne possède qu'une très faible activité. L'élution la plus complète s'obtient par extraction en solution aqueuse phosphatée bisodique. La capacité d'adsorption des sels d'aluminium est limitée : plus elle est perfusée, moins la colonne manifeste d'avidité pour le toxoïde. Le sel est saturé lorsqu'il a donné passage à 10 fois son poids de toxoïde original. Si l'on dilue l'anatoxine, l'adsorption absolue reste inchangée. Dans l'éluat final, les degrés de concentration et de purification restent uniquement fonctions de la *quantité* d'antigène original et ne sont pas influencés par la dilution de cet antigène au moment de sa perfusion.

Après passage d'une première colonne de chromatographie, la totalité de l'antigène n'est pas adsorbée ; le filtrat contient encore des U.F. Ce filtrat, perfusé dans une nouvelle colonne, abandonne de nouveau de l'antigène. On peut ainsi, par adsorptions successives, épuiser totalement l'antigène original. Il est intéressant de noter (exp. 8) que si l'éluat issu de la première colonne est le plus riche en U.F., il n'est pas plus purifié que dans la seconde colonne ; dans une troisième colonne, on retrouve de l'azote mais pas d'U.F. Il faut donc admettre :

a) que la fixation de l'antigène sur le sel d'aluminium entraîne toujours des matières protéiniques ;

b) que cette fixation n'est pas spécifique, sensu stricto, puisque dans une deuxième colonne le degré de purification est aussi grand que dans la première colonne, et que l'adsorbant fixe des matières azotées sans antigène dans une troisième colonne ;

c) que l'antigène est toutefois lié au groupe de protéines qui sont le plus facilement adsorbées par les sels d'aluminium.

Notons enfin que tous les échantillons d'anatoxine diphtérique ne se prêtent pas à la chromatographie avec une même chance de succès. Certains toxoïdes sont facilement adsorbables, d'autres moins ; nous retrouvons ici cette individualité physico-chimique des toxoïdes dont nous avons parlé déjà à propos de la salure au sulfate de soude.

La chromatographie des *concentrés* d'antigène, obtenus par salure, ne donne pas de résultats pratiques. La concentration réalisée est encore plus faible que pour les anatoxines originales. L'index P ne dépasse pas 2,5 ; *il peut être même*

inférieur à 1,0 c'est-à-dire que le filtrat est plus pauvre en azote par U.F. que l'éluat (exp. 12). Nous pouvons peut-être en déduire que les protéines éliminées par la salure sont justement celles qui, lors de l'adsorption sur les sels d'aluminium, entraînent le toxoïde : l'antigène pur n'aurait, pour les adsorbants examinés, pas d'affinité particulière et son adsorption serait conditionnée par la présence de certaines molécules protéiniques plus ou moins différenciées (présentes dans l'anatoxine originale, mais absentes ou très peu abondantes dans le concentré obtenu par salure).

III. Essais d'immunisation avec des toxoïdes concentrés et purifiés

La *concentration* d'un toxoïde permet d'inoculer une quantité déterminée d'antigène sous un volume plus restreint, ou encore pour un volume donné d'administrer une masse plus considérable d'antigène. Nous savons par ailleurs *(Prigge)* (11) que le titre floculant d'un toxoïde ne présume pas rigoureusement de sa valeur immunisante, des anatoxines à faible teneur en U.F. pouvant conférer parfois une meilleure protection spécifique que d'autres toxoïdes plus riches en U.F. Le pouvoir immunisant d'un antigène diphtérique ne peut être établi que par des expériences in vivo, sur l'homme ou chez l'animal. Nous avons conduit nos premiers essais sur le cobaye en cherchant à déterminer l'activité des produits suivants, issus d'une *même* anatoxine diphtérique :

x U.F. dans 1 cc (= a mgr. N) d'anatoxine brute
x U.F. dans 1 cc (= b mgr. N) d'anatoxine purifiée
y U.F. dans 1 cc (= b mgr. N) d'anatoxine purifiée.

Il devenait possible de déterminer ainsi le rôle :

1. de la quantité des unités floculantes ;
2. de la quantité d'azote.

Dans un autre groupe d'expériences, nous avons tenté de remplacer le rôle adjuvant des protéines non spécifiques par un sel d'aluminium représenté par une colonne de chromatographie.

Préparation des antigènes.

L'anatoxine diphtérique 1186 titre 16 U.F. et 8,809 mgr. N par cc.

Après précipitation au sulfate de soude, la mousse recueillie entre 21 et 25 % de salure donne un concentré qui jauge 165 U.F. et 13,930 mgr. N par cc.

L'anatoxine et le concentré sont chromatographiés sur oxyde d'alumine de Siegfried selon deux techniques :

1) Colonnes disposées sur *entonnoir à fond plat* d'un diamètre de 6 cm., et formées par 30 gr. de sel. Les colonnes ont une hauteur de 1,5 cm. environ. On passe 300 cc d'anatoxine (l'élution est faite avec 100 cc de solution phosphatée) ou 100 cc de concentré (élution dans 100 cc).

2) Colonnes montées en tubes de verre de 16 mm. de diamètre et contenant 15 gr. de sel. Les colonnes ont une hauteur de 6-8 cm. On passe 150 cc d'anatoxine («élution» dans 25 cc de soluté physiologique, cf. plus loin) ou 50 cc de concentré (l'adsorbat est repris dans 25 cc de soluté physiologique, cf. plus loin).

Toutes les adsorptions furent effectuées à pH 5,3. A la fin de ces opérations, nous étions en possession de 10 antigènes différents dont les caractéristiques : titre floculant, teneur en azote par cc ou par U.F. et index P sont rapportés dans le tableau 30.

TABLEAU 30.

Caractéristiques des antigènes obtenus à partir de l'anatoxine diphtérique 1186 après salure au sulfate de soude ou chromatographie.

Antigène	U.F./cc.	mgr. N/cc	mgr. N/U.F.	Index P
A. Anatoxine diphtérique 1186				
*1. **TOXOIDE BRUT**	16,0	8,809	0,551	**1,0**
*2. **ELUAT** de la colonne de chromatographie sur **entonnoir à fond plat**	19,5	3,808	0,195	**2,8**
*3. **FILTRAT** de la colonne de chromatographie sur **entonnoir à fond plat**	9,5	6,850	0,721	**0,8**
*4. **ELUAT** de la colonne de chromatographie en **tube de verre**	18,7 (calculé)	4,347 (calculé)	0,232	**2,4**
5. **FILTRAT** de la colonne de chromatographie en **tube de verre**	8,5	7,070	0,832	**0,7**
B. Concentré à 21-25 % (1186)				
*6. **CONCENTRE BRUT**	165,0	13,930	0,084	**6,6**
7. **ELUAT** de la colonne de chromatographie sur **entonnoir à fond plat**	55,0	5,600	0,102	**5,4**
8. **FILTRAT** de la colonne de chromatographie sur **entonnoir à fond plat**	97,0	6,792	0,070	**7,9**
9. **ELUAT** de la colonne de chromatographie en **tube de verre**	103,0 (calculé)	10,901 (calculé)	0,106	**5,2**
10. **FILTRAT** de la colonne de chromatographie en **tube de verre**	93,0	6,299	0,068	**8,1**

*) Antigènes utilisés plus loin pour l'immunisation du cobaye.

Dans le tableau 30, les titres des éluats 4 et 9 furent calculés. En effet, la colonne ne fut pas à proprement parlé éluée comme ce fut le cas pour les éluats 2 et 7, pour lesquels la technique décrite plus haut fut appliquée. Les éluats 4 et 9 représentaient en réalité une suspension : les colonnes furent reprises simplement dans un faible volume (25 cc) de soluté physiologique, le sel d'aluminium restant en suspension dans le liquide.

L'anatoxine diphtérique 1186 n'est pas un toxoïde qui permette une grande purification ; à 21-25 % de salure, le concentré n'a qu'un index de 6,6, c'est-à-dire qu'en comparaison de l'antigène original l'U.F. ne fut débarassée que du 85 % de son azote.

Les observations énoncées plus haut à propos de la chromatographie des anatoxines et des concentrés sont particulièrement bien transposables ici :

La chromatographie permet de purifier légèrement *l'anatoxine* (index P des éluats 2 et 4 : 2,8 et 2,4). Elle n'obtient pas de purification sur les *concentrés* réalisés par salure : les éluats 7 et 9 ont un index plus faible que le concentré d'origine, tandis que les filtrats représentés par le liquide après passage de la colonne de sel contiennent par U.F. moins d'azote que le concentré brut.

Animaux.

Des lots de 7 cobayes (la pénurie d'animaux fixa l'étendue de nos recherches) furent assemblés selon la technique de *Prigge* (11) et *Schäfer* (31). Les sujets pesaient de 230 à 660 grammes, mais le total des poids pour 1 lot fut constant : 2980—2990 grammes, soit en moyenne 427 grammes par animal.

Inoculation et épreuve d'immunité.

Tous les animaux d'un même lot furent traités avec le même antigène. Après 3 inoculations de toxoïde, les cobayes furent soumis à une prise de sang par ponction car-

diaque, puis à l'injection d'une dose d'épreuve de toxine diphtérique.

Les principaux temps de l'expérience sont relatés dans le tableau 31.

TABLEAU 31.

Calendrier de l'immunisation et des épreuves d'immunité.

Traitement	Date	soit .... jours après la 1re inject. d'antigène	soit .... jours après la 3me inject. d'antigène
1re injection	29. 5. 43	0	—
2me injection	24. 6. 43	26	—
3me injection	9. 7. 43	39	—
Prise de sang	3. 8. 43	64	25
Epreuve d'immunité	9. 8. 43	70	31

Le 5. 8. 43, dans l'ignorance où nous étions sur la dose d'épreuve, nous avons pratiqué quelques inoculations d'orientation sur lesquelles nous reviendrons plus loin.

Antigènes.

3 lots de cobayes furent inoculés avec l'anatoxine diphtérique originale ;

1 lot avec l'éluat No 2 (tableau 30) ;

1 lot avec le filtrat No 3 (tableau 30) ;

1 lot avec l'éluat $+Al_2O_3$ No 5 (tableau 30) ;

1 lot avec le concentré à 21-25 % No 6 (tableau 30).

Les doses de l'antigène furent calculées de telle façon que chaque injection comportât :

1) le même nombre d'U.F. :20 U.F. ;

2) le même volume de liquide : 4,0 cc.

Dérivant tous d'un même toxoïde, les différents antigènes pouvaient être rigoureusement comparés dans leur pouvoir immunisant.

Les solutions d'antigène furent préparées selon la technique suivante :

1. *Anatoxine diphtérique brute* 1186 (16 U.F./cc)
   1,25 cc anatoxine 1186 + 2,75 cc sol. physiologique.
2. *Eluat de chromatographie No 2* (19,5 U.F./cc)
   10,0 cc éluat + 29,0 sol. physiol.
3. *Filtrat de chromatographie No 3* (9,5 U.F./cc)
   10,0 cc éluat + 9,0 cc sol. physiol.
4. *Suspension de la colonne = éluat No 4* (18,7 U.F./cc)
   5,0 cc suspension + 13,7 cc. sol. physiol.
5. *Concentré à 21-25 % brut* (165 U.F./cc)
   1,0 cc du concentré + 32,0 cc sol. physiol.

Selon *Prigge* (11) le poids du cobaye ne joue pas de rôle sensible lors de l'immunisation. Quel que fût son poids, chacun de nos cobayes reçut la même quantité d'antigène sous un volume identique. Les inoculations furent faites sous la peau de la paroi abdominale.

Titration des sera.

25 jours après la 3me injection d'antigène, nous avons prélevé 6-8 cm^3 de sang chez chaque animal par ponction cardiaque ; le sérum fut conservé à la glacière sans adjonction d'antiseptique. Le titre antitoxique fut déterminé par inoculations intracutanées chez le lapin, en présence d'un sérum-étalon de Francfort s. M., avec la toxine étalon de Berne (toxine diphtérique 500). Les caractéristiques de cette toxine pour le cobaye étaient les suivantes :

dlm_4 : 0,00125 cc

L + : 0,048 cc.

Par de multiples essais préliminaires, nous avons fixé les valeurs Ln et Ln/10 utilisées pour la titration des sera (*Ln* étant défini par la plus petite quantité de toxine qui, ajoutée à 1/100me unité antitoxique dans un volume de 2 cc, et inoculée intracutané à la dose de 0,1 cc du mélange, provoque une nécrose).

Chaque échantillon de sérum fut ensuite étudié sur différents lapins selon une technique analogue à celle décrite par *Regamey* (32) lors des titrations tétaniques.

Toxine d'épreuve.

Quelle quantité de toxine les cobayes immunisés 3 fois étaient-ils capables de supporter ? En inoculant trop de poison, nous risquions de tuer tous nos animaux ; en donnant une dose trop petite, nous n'aurions pas pu discerner des degrés d'immunité chez les survivants. Les calculs théoriques se basèrent d'une part sur les expériences de *Klinkhart* et *Regamey* (33), puis sur les titres antitoxiques du sérum des animaux. Après une expérience de tâtonnement, où les cobayes de contrôle furent éprouvés avec 500 et 2500 dlm_4, la dose d'épreuve fut fixée à *2000 dlm_4 pour 250 grammes de cobayes*.

Ces 2000 dlm_4 étant contenues dans 2,5 cc de liquide et la toxine étalon de Berne titrant 800 dlm_4 au cc, l'épreuve d'immunité était fort simplifiée. Il suffisait d'inoculer :

le cobaye de 250 grammes avec 2,5 cc ou
le cobaye de 310 grammes avec 3,1 cc ou encore
le cobaye de 650 grammes avec 6,5 cc

de *toxine pure*.

Résultats des titrations sériques et des épreuves d'immunité.

Antigène : *Anatoxine diphtérique brute*
lots 1, 11 et 12 = 21 cobayes ;
survivants au 3. 8. 43 : 15 cobayes.

TABLEAU 32.

Immunité après 3 injections d'anatoxine brute.

Cobaye No	Poids en gr. le		Dose (en dlm_4)	Titre (en U.A./cc de sérum)	Résultat de l'intoxication
	29. 5. 43	5. 8. 43			
A. Essais de la dose d'épreuve					
24	660	655	500	5	survie
42	410	440	500	10—15	† 9
31	440	440	2500	15—20	† 4
61	230	330	2500	7—10	† 3
B. Expérience principale					
1	355	390		15—20	survie
3	470	480		20	† 2 ¾
4	570	545		10	survie
8	310	290		5—7	»
9	520	450	2000	25	»
33	490	505		5—7	»
34	350	380		40	»
40	460	410		50	† 3 ¼
49	470	450		20	survie
53	260	320		25—30	survie
55	300	360		5—7	† 2 ½

† = mort de diphtérie en .... jours.

En règle générale les cobayes n'ont guère prospéré au cours de leur immunisation ; les gains de poids sont très faibles. Un certain nombre d'animaux sont morts avant d'avoir été soumis aux épreuves d'immunité.

Il n'y a pas de concordance entre le titre antitoxique du sérum et la résistance à l'intoxication : le cobaye No 33 ne possède que 6 U.A./cc de sérum et survit à l'inoculation de 2000 dlm_4, tandis que le cobaye No 40, dont le sérum titre 50 U.A./cc succombe à la même quantité de toxine.

Antigène : *éluat de chromatographie No 2.*

TABLEAU 33.

Immunité après 3 injections d'éluat.

Cobaye No	Poids en gr. le		Titre sérique en U.A./cc de sérum	Résultat de l'intoxication
	29. 5. 43	5. 8. 43		
10	440	430	15—20	mort inter. 6. 8.
14	410	380	25	
26	650	680	5	† 3 ½
27	460	460	25—30	survie
32	460	570	10—15	† 2 ½
52	340	mort interc. 6.7.		
63	230	mort interc. 6.8.		

Ce lot d'animaux a beaucoup pâti de morts intercurrentes ; nous ne pouvons tenir compte que de 3 cobayes sur 7.

Antigène : *filtrat de chromatographie No 3.*

TABLEAU 34.

Immunité après 3 injections de filtrat.

Cobaye No	Poids en gr. le		Titre sérique en U.A./cc. de sérum	Résultat de l'intoxication
	29. 5. 43	5. 8. 43		
11	360	270	20—25	† 1
21	490	440	7—10	† 9
22	380	350	10—15	† 1 ½
23	330	345	35	survie
36	450	440	25—30	survie
47	430	440	5	† 4 ½
48	550	470	5—7	survie

Antigène : *Eluat de chromatographie No 4.*

Cet antigène était difficile à inoculer ; il était en effet constitué par la colonne d'adsorption elle même suspendue dans une solution physiologique. Au moment de l'inoculation, il fallait agiter vivement l'antigène et le pousser rapidement sous la peau. Les injections laissèrent in situ un petit dépôt qui ne se résorba pas.

TABLEAU 35.

Immunité après 3 injections de suspension de colonne.

Cobaye No	Poids en gr. le		Titre sérique en U.A./cc. de sérum	Résultat de l'intoxication
	29. 5. 43	5. 8. 43		
6	400	360	40	survie
18	540	435	7—10	»
38	460	390	20—25	† 2 ½
45	400	410	25	survie
46	470	360	25—30	»
50	450	490	20—25	»
58	270	370	30—40	»

La plupart des animaux de cette série ont passablement maigri pendant l'expérience. Ils jouissent dans l'ensemble d'un titre antitoxique assez égal.

Antigène : *concentré à 21-25 % No 6.*

TABLEAU 36.

Immunité après 3 injections de concentré obtenu par salure.

Cobaye No	Poids en gr. le		Titre sérique en U.A./cc. de sérum	Résultat de l'intoxication
	29. 5. 43	5. 8. 43		
2	470	420	4	† 1 ½
17	390	360	3—4	† 2 ¼
25	440	460	15—20	mort inter. 9. 8.
29	420	450	3—4	† 2 ½
30	430	360	15—20	† 7
51	600	580	5—7	† 2 ½
57	240	230	10—15	† 1 ¼

DISCUSSION

Si les résultats obtenus chez l'animal présentent des différences d'un antigène à l'autre, nous devons manifester une certaine prudence lors de leur interprétation. Chaque lot, avec ses 7 cobayes au départ, est d'un effectif bien faible ; la dispersion imputable à l'individualité de l'animal peut, dans une petite série, être relativement grande. Nos expériences ont toutefois l'avantage d'étudier simultanément deux degrés d'immunité : l'un, d'ordre humoral, se mesure en U.A. par cc du sérum ; l'autre, résultante de tous les facteurs qui engendrent l'immunité dans son sens le plus large, s'exprime par le pourcentage de sujets survivants à une intoxication d'intensité égale pour chacun.

Chaque cobaye ayant reçu la même *quantité d'antigène,* soit 20 U.F. et tous les antigènes dérivant d'une *même anatoxine* diphtérique, les différences d'immunité relevées entre les lots résultent directement de la qualité immunisante de l'antigène.

Voici placés selon l'ordre de leur activité, les antigènes examinés.

	Titre moyen par cobaye (U. A.)	0/0 survivants à la dose d'épreuve	Index P
Eluat en suspension No 4	25,9	86 (6/7)	2,3
Anatoxine 1186	20,7	73 (8/11)	1,0
Filtrat No 3	15,3	43 (3/7)	0,8
Eluat No 2	15,0	33 (1/3)	2,8
Concentré 21-25 %	9,2	0 (0/6)	6,7

Il y a ici parallèlisme parfait entre le titre antitoxique d'un lot et le pourcentage des survivants à la dose d'épreuve : plus la teneur en U.A. est faible, moins nombreux sont les individus immuns.

C'est l'éluat No 4 qui se révèle le meilleur antigène : il était représenté par une suspension de la colonne de chromatographie en solution physiologique. A l'endroit de l'injection il se formait chez le cobaye un petit nodule non résorbable, dû à l'insolubilité de l'oxyde d'aluminium. Cet antigène, dont l'index P était de 2,3, débarassé du 55 % des protéines de l'anatoxine originale, jouit d'une grande activité, soit à cause de l'excitation locale non spécifique provoquée par le sel d'aluminium, soit grâce à la plus lente diffusion de l'antigène dans l'organisme, puisque l'élution du toxoïde n'avait pas été poussée in vitro.

Pour les quatre antigènes restants, le pouvoir immunisant est d'autant *plus faible que l'index P est plus grand*. Plus le toxoïde est purifié, moins il immunise. Cette constatation est particulièrement nette si l'on compare l'anatoxine 1186 (dont les 20 U.F. sont liées à *11,02 mgr.* d'azote) et le concentré à 21-25 % (dont les 20 U.F. ne sont fixées qu'à *1,68 mgr.* d'azote). Pour un toxoïde donné, la purification — en éliminant du ballast non spécifique — diminue ipso facto le pouvoir immunisant. Rapprochons cette observation de celle que nous avons relevée au sujet de l'«éluat» No 4, sur l'utilité de la présence d'un sel mal résorbé et fixant plus ou moins solidement le toxoïde. Nous pourrons en conclure que la purification de l'anatoxine par simple élimination du ballast non spécifique n'est pas désirable, le pouvoir immunisant de l'antigène s'affaiblit trop. Il est indiqué d'adsorber le toxoïde à un sel peu soluble qui prolonge lo-

calement*) et dans le temps l'excitation antigénique accessoire, mais si utile du ballast.

Nos résultats ne confirment pas ceux de *Theorell* et *Norlin* (8), qui obtinrent une meilleure immunité avec des antigènes privés de la plus grande partie de leurs protéines non spécifiques.

*) Les récentes recherches de **Farago et Ujhelyi** (35) semblent n'attribuer à l'hydroxyde d'aluminium qu'une activité d'adsorbant, prolongeant l'excitation antigénique dans le temps seulement. Le sel d'aluminium ne jouerait pas le rôle d'adjuvant non spécifique dans l'élaboration de l'antitoxine.

Conclusions

Nous avons étudié deux méthodes de concentration et de purification pour l'anatoxine diphtérique : la salure au *sulfate de soude* et la *chromatographie*.

Lorsqu'on ajoute 20 % et plus de sulfate de soude à l'anatoxine diphtérique, il se forme à la surface du liquide une «mousse» que l'on peut facilement écumer et reprendre dans l'eau. Cette solution ou «*concentré*» du toxoïde a des propriétés fort variables selon l'échantillon de toxoïde brut, selon la concentration saline à laquelle elle fut acquise. Chaque lot d'anatoxine diphtérique possède une individualité physico-chimique propre ; il existe cependant certaines lois générales que nous pouvons déduire de nos expériences.

La quantité totale de mousse recueillie à saturation varie d'une anatoxine à l'autre ; elle correspond au 1,9-4,08 % du poids de l'anatoxine. Cette quantité n'est sous la dépendance ni de la teneur en azote total, ni de la valeur antigénique du toxoïde.

Plus la concentration saline est grande, plus il y a de mousse qui se forme. Le poids de la mousse se révèle dans l'ensemble, fonction directe du taux de salure. Cependant il existe des taux de salure fractionnée où les poids des mousses sont proportionnellement plus élevés ; ces maxima se rencontrent alors soit entre 25 et 30 %, soit entre 36 et 40 % de sulfate de soude.

Reprises dans de l'eau tiède et soumises à la dialyse, les mousses — ou concentrés — manifestent une certaine hygroscopie. Cette hygroscopie ne revêt toutefois aucune régularité apparente bien caractéristique. Le plus souvent, les concentrés à basse salure attirent peu d'eau, se comportant ainsi comme des solutions de globulines ; par contre, les concentrés obtenus à salure élevée, émanant de mousses très visqueuses, sont plus hygroscopiques et se rapprochent des solutions de type albumineux.

La salure au sulfate de soude permet de *concentrer* considérablement l'antigène, Partis d'anatoxines titrant de

10,5 à 40,0 U.F./cc, nous avons préparé des concentrés jaugeant *plus de 1000 U.F./cc ;* mais cette concentration ne réalise un intérêt véritable que si elle ne s'accompagne pas d'une augmentation concommittente d'azote. La *purification* est fort variable selon les taux de salure ; elle est toujours optima entre 20 et 30 % de sulfate de soude. Tout se passe comme si l'adjonction de sel à l'anatoxine sollicitait tout d'abord les molécules de toxoïde ou les molécules de protéines qui entraînent le toxoïde ; on peut en déduire que dans la suspension colloïdale représentée par l'anatoxine diphtérique brute, le toxoïde est constitué par de grosses molécules du milieu, mais ce n'est pas seulement aux faibles concentrations d'électrolytes que précipite le toxoïde ; les fortes salures entraînent encore de nouvelles fractions d'antigène. L'on peut ainsi se demander si l'antigène diphtérique ne serait pas de nature complexe, formé par des molécules spécifiques de dimensions variables ; à moins que, molécule fixe et chimiquement bien définie, l'antigène ne soit lié à des molécules non spécifiques assez diverses, plus volontiers à de grosses molécules rapidement déséquilibrées par de faibles concentrations salines.

Un phénomène digne d'intérêt réside dans le fait que *la zone de purification optima* ne correspond pas à *la zone de précipitation optima* de l'antigène : c'est en dessous de 25 % de salure que l'index P est le plus grand, tandis que c'est entre 26 et 30 %, voire même parfois entre 31 et 35 % de salure que l'on récupère le maximum d'antigène. Nos expériences ne nous permettent pas d'expliquer cette constatation.*)

---

*) La répartition de l'antigène dans les différentes fractions de mousses obtenues par salure au sulfate de soude est soumise aux lois suivantes :

a) ce sont les faibles solutions d'électrolytes qui donnent les concentrés les plus purs ;

b) la zone d'extraction maxima de l'antigène ne se trouve pas dans la zone de purification optima ;

c) l'adjonction de nouvelles fractions de sel entraîne constamment de nouvelles quantités d'antigène, et ceci jusqu'à ce que la saturation soit atteinte.

Parmi les nombreuses explications que l'on peut être tenté de fournir, nous formulons l'hypothèse suivante :

L'antigène diphtérique est une molécule lourde qui, dans une suspension colloïdale, a tendance à s'accoler soit à des congénères,

La purification la meilleure que nous ayions observée concerne un antigène qui fut débarassé du 97,2 % de son azote initial.

Il est possible de soumettre un toxoïde à plusieurs purifications successives.

Le rendement de la concentration et de la purification par le sulfate de soude est également variable selon les échantillons d'anatoxine. Pour obtenir un concentré pauvre en azote, il faut employer peu de sel : à 30 % de salure, par exemple, certains toxoïdes permettent déjà de récupérer le 80 % de l'antigène, tandis que d'autres n'en livrent qu'à peine 20 %.

En règle générale, la *salure au sulfate de soude* représente une *méthode simple et économique* pour *revaloriser les mauvais lots* d'anatoxine diphtérique ou pour préparer des antigènes *concentrés* et *purifiés* (c'est-à-dire plus riches

---

soit à d'autres molécules protéiniques, formant ainsi toute une mosaïque de micelles.

Si : A = molécule d'antigène,
B = molécule protéinique

les possibilités d'association sont telles schématiquement :

A	A	A	A	P
AAA	AAA	AAP	PAP	PAP
A	P	P	P	P

Une suspension d'antigène pur ne comprendrait que des molécules A et des micelles A + x A.

A étant une molécule lourde, conditionnant la grande sensibilité de la micelle à l'égard de la concentration électrolytique, aux faibles salures, ce sont les micelles du type $\frac{A}{AAA}$ et $\frac{A}{AAA}$ qui sont les plus instables, qui précipitent les premières ; mais elles contiennent l'antigène le plus pur. Les mousses qui se forment aux taux voisins de la saturation possèdent beaucoup d'azote et sont très peu purifiées parce qu'elles correspondent au type $\frac{P}{PAP}$.

Le fait que la zone d'extraction maxima de l'antigène ne correspond pas à la zone de purification optima, relève de la proportion des différentes micelles. Les micelles du type $\frac{A}{AAA}$ et $\frac{A}{PAP}$ seraient les plus rares ; celles du type $\frac{A}{AP}$ par exemple, seraient les plus abondantes et correspondraient aux micelles précipitées entre 26-30 et 35 % de sulfate de soude.

que le toxoïde original en U.F., l'U.F. étant elle-même plus pauvre en azote total).

La *chromatographie*, par contre, *ne nous a pas*, dans nos conditions d'expériences, *donné de résultats pratiques dignes d'intérêt*. Méthode assez délicate, son efficacité dépend de l'activité des adsorbants choisis et du pH. L'anatoxine diphtérique ne se laisse pas aussi électivement adsorber que la toxine homologue. Nos meilleurs produits contenaient encore près de 25 % de l'azote original, les concentrations de l'antigène restant faibles ; quelques anatoxines et concentrés d'antigène obtenus par salure ne permirent aucune purification.

Nous avons enfin recherché sur l'animal la différence entre le pouvoir immunisant de l'anatoxine originale et celui des antigènes purifiés. La détermination du titre de l'antitoxine dans le sérum des cobayes et les pourcentages d'animaux survivant à une dose d'épreuve ont donné des résultats superposables. Pour une même dose de toxoïde (déterminée en U.F.) le pouvoir immunisant est d'autant plus faible que l'antigène contient moins d'azote. Ainsi, *les produits purifiés immunisent relativement plus mal*. Toutefois, si l'on remplace le ballast inutile par un sel d'aluminium — et bien que l'index P du produit soit élevé — l'immunité est plus solide qu'après injection de l'anatoxine originale.

Littérature

1. **Eaton M.D.:** The purification and concentration of diphteria toxin. J. of Bact. **31,** 347 (1936).
2. **Pappenheimer A.M. and S. J. Johnson:** Studies in diphteria toxin production. A simple gelatin hydrolysate medium and some properties of the toxin produced thereon. Brit. J. exper. Path. **18,** 239 (1937).
3. **Boivin A.:** Sur la nature chimique de la toxine et de l'anatoxine diphtériques. C. R. Soc. Biol. **126,** 218 (1937).
4. **Pope C. G. and F. V. Linggood:** Purification of diphteria toxoid. Brit. Journ. exp. Path. **20,** 297 (1939).
5. **Watson A.F. and V. Wallace:** Changes in the culture medium during the growth of B. diphteriae. Journ. of Path. a. Bact. **27,** 271 (1924).
6. **Hansen et S. Schmidt:** Sur la purification de la toxine diphtérique au moyen de l'alcool et de l'acétone. C. R. Soc. Biol. Paris **105,** 332 (1930).
7. **Wadsworth A., Quigley J. and Sickles:** The purification and concentration of diphterie toxoid. J. exper. Med. **55,** 815 (1932).
8. **Theorell H. et G. Norlin:** Hochgereinigtes Diphtherieantigen. Zschr. f. Immun. forschg. **91,** 62 (1937).
9. **Zajdel R.:** Sur la purification et la condensation de l'anatoxine diphtérique par l'ultrafiltration. C. R. Soc. Biol. Paris **111,** 1029 (1932).
10. **Ramon G.:** La floculation dans les mélanges de toxine et de sérum antidiphtérique. Ann. Inst. Pasteur, Paris **37,** 1001 (1923).
11. **Prigge R.:** Die staatliche Prüfung der Diphtherieimpfstoffe und ihre experimentellen Grundlagen. Arbeiten a. d. Staatsinstitut f. exp. Therapie **32,** 1 (1935).
12. **Brandwijk A.C. und A. Tasman:** Reinigung von Diphtherietoxin durch Aussalzung mit Ammonsulfat. Zschr. f. Immun. forschg. **77,** 390 (1932).
13. **Tasman A. und A.C. Brandwijk:** Reinigung und Konzentrierung von Diphtherietoxin und -anatoxin. Zschr. f. Immun. forschg. **81,** 137 (1933).
14. **Tasman A. und J.P. van Wassbergen:** Reinigung von Diphtherietoxin und Anatoxin. Vergleichende Reinigungen durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd und Fällung mit Aluminiumsulfat. Zschr. f. Immun. forschg. **75,** 164 (1932).

15. **Schmidt S.:** Sur l'adsorption de la toxine diphtérique par l'hydroxyde d'aluminium.
C. R. Soc. Biol. Paris **103,** 1296 (1930).

16. **Schmidt S.:** Sur le mode de préparation des toxines et anatoxines diphtériques purifiées et hyperconcentrées.
C. R. Soc. Biol. Paris **107,** 327 (1931).

17. **Schmidt S., A. Hansen et J. A. Kjaer:** Purification et concentration de la toxine et de l'anatoxine diphtériques.
Ann. Inst. Pasteur Paris **46,** 202 (1931).

18. **Willstäter R. und H. Kraut:** Ueber die Hydroxyde und ihre Hydrate in den verschiedenen Tonerdegelen.
Chem. Berichte **57,** 1082 (1924).

19. **Willstäter R. und H. Kraut:** Ueber ein Tonerde-Gel von der Formel $Al(OH)_3$.
Chem. Berichte **56,** 149 (1923).

20. **Jensen C.:** Immunisation antidiphtérique des enfants par une injection unique d'anatoxine diphtérique purifiée et concentrée.
C. R. Soc. Biol. Paris **108,** 528 (1931).

21. **Glenny A.T., Buttle G.A.H. and Stevens:** Rate of disappearance of diphteria toxoid injected into rabbits and guinea-pigs: toxoid precipitated with alum.
J. of Path. **34,** 267 (1931).

22. **Glenny A. T.:** Insoluble precipitates in diphteria and tetanus immunization.
Brit. med. J. **II,** 244 (1930).

23. **Glenny A.T. and H. Barr:** The precipitation of diphteria toxoid by potash alum.
Journ. of Path. a. Bact. **34,** 131 (1931).

24. **Tasman A. und A.B.F.A. Pondman:** Zur Reinigung des Diphtherietoxins und Anatoxins.
Zschr. f. Immunforschg. **72,** 245 (1931).

25. **Ecker E. E. and L. A. Weed:** Studies on the adsorption of diphteria toxin to and elution from magnesium hydroxide.
J. of Immunol. **22,** 61 (1932).

26. **von Klobusitzky D.:** Concentration of tetanic antitoxin by adsorption.
J. of Immunol. **35,** 329 (1938).

27. **Tswett M.:** Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls.
Bericht der deutschen botanischen Gesellschaft **24,** 384 (1906).

28. **Ballinari R.:** Studien über die Anwendung der strömenden Adsorption (Chromatographie) zur Reinigung und Konzentrierung bakterieller Toxine.
Inauguraldissertation, Bern 1941.

29. **Zechmeister und von Cholnoky:** Die chromatographische adsorptionsmethode.
Verlag J. Springer, 2. Aufl., 1938.

30. **Schmidt S. A., Hansen et K. A. Kjaer :** Purification et concentration de la toxine et l'anatoxine diphtériques.
Ann. Inst. Pasteur **46,** 202 (1931).

31. **Schäfer W. :** Variationsstatistische Untersuchungen zur Wertbestimmung von Diphtherieimpfstoffen.
Arb. a. d. Staatsinstitut f. exp. Therapie Fasc. **32,** pg. 51 (1935).

32. **Regamey R. :** Résultats sérologiques chez les soldats suisses vaccinés contre le typhus-paratyphus-tétanos (T.P.T.).
Schweiz. Zschr. allg. Path. u. Bakt. **3,** 304 (1941).

33. **Klinkhart G. und R. Regamey :** Ueber den Einfluss der Höhenlage auf die Immunisierbarkeit kleiner Versuchstiere gegen Diphtherietoxin.
Zschr. Immunforschg. **99,** 386 (1941).

34. **Farago F. und K. Ujhelyi :** Neuere Untersuchungen über die Depotwirkung des niederschlaghaltigen Impfstoffes.
Zschr. Immun. forschg. **101,** 178 (1942).